



Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi

CONSORZIO INTERUNIVERSITARIO

X CONVEGNO NAZIONALE

SU

SCIENZE DELLA VITA

ROMA, 22-23 OTTOBRE 2012

CNR

X CONVEGNO NAZIONALE I.N.B.B.

<i>Comitato Scientifico</i>

Prof. Damiano Gustavo Mita

Prof. Enrico Rizzarelli

Prof. Paolo Viglino

<i>Segreteria Organizzativa</i>
--

I.N.B.B.

Viale delle Medaglie D'Oro, 305

00136 Roma

Tel 06/35340153 Fax. 06/35451637

inbbamm@inbb.it

www.inbb.it

INDICE

<i>Programma X Convegno Nazionale</i>	<i>Pag.</i>	<i>5</i>
<i>Relazione introduttiva del Presidente Prof. D.G. Mita</i>	<i>Pag.</i>	<i>9</i>
<i>Abstract comunicazioni scientifiche</i>	<i>Pag.</i>	<i>13</i>
<i>Abstract ricercatori non strutturati</i>	<i>Pag.</i>	<i>53</i>
<i>Unità di Ricerca INBB</i>	<i>Pag.</i>	<i>69</i>

X CONVEGNO NAZIONALE I.N.B.B.
Programma

LUNEDI' 22 OTTOBRE

h. 10,30 ***Registrazione dei partecipanti***

h. 11,00 ***Apertura dei Lavori***
PROF. DAMIANO GUSTAVO MITA (Presidente INBB)

h. 11,30 – 13,00 Tavola Rotonda
*“LA RICERCA SCIENTIFICA E TECNOLOGICA
COME INVESTIMENTO PER UN FUTURO DI CRESCITA”*

Presiede: PROF. DAMIANO GUSTAVO MITA (Presidente INBB)

Introduce: DOTT. PAOLO OCCHIALINI
(Direttore INBB)

Partecipano: DOTT. PAOLO ANNUNZIATO
(Direttore Generale CNR)
PROF. SSA CINZIA DARAIO
(Esperto - Università “La Sapienza” Roma)
DOTT. EMILIO STEFANELLI
(Pres. Farindustria Comm. PMI)
ON. WALTER TOCCI
(Comm. Cultura Camera)
PROF. TEODORO VALENTE
(Presidente INSTM)

Conclude: DOTT. EMANUELE FIDORA
(Direttore Generale Ricerca MIUR)

h. 13,00 ***Pausa***

h. 14,30 – 16,00 ***Sessione “Malattie Neurodegenerative”***

Chairman: PROF. LUCIO ANNUNZIATO
Univ. Napoli “Federico II”

PROF. MAURIZIO TAGLIALATELA – Univ. CB
"Canali del potassio e neuroprotezione"

PROF. ANTONIO CONTESTABILE – Univ. BO

"Identificazione e caratterizzazione di sostanze neuroprotettive nelle interazioni fra microglia e neuroni"

DOTT. SSA STEFANIA RIGACCI – Univ. FI

“Unraveling the beneficial effects of oleuropein aglycone against Alzheimer's disease”

PROF.SSA ADRIANA MAGGI – Univ. MI

“Invecchiamento, neurodegenerazione e ormoni sessuali”

PROF. VITTORIO CALABRESE – Univ. CT

“Redox regulation of cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders: role of hormesis and vitagenes”

h. 16,00 ***Pausa***

h. 16,30 - 18,00 ***Sessione “Nanobioteconologie”***

Chairman: PROF. PAOLO NETTI
 Univ. Napoli “Federico II”

PROF. JOSÈ MARIA KENNY – Univ. PG

“Biomateriali nanostrutturati a matrice polimerica: nanoparticelle, nanocompositi e nanotopografia”

PROF. SSA CARMELINA RUGGIERO – Univ. GE

“L’integrazione tra la bioinformatica e la nanotecnologie per la diagnosi e la terapia”

PROF.SSA MARIA LETIZIA FOCARETE – Univ. BO

“Scaffold biomimetici costituiti da nanofibre polimeriche per l’ingegneria dei tessuti”

PROF. VALERIO MAGNAGHI – Univ. MI

“Scaffolds biocompatibili per la rigenerazione dei nervi”

PROF.SSA ANTONINA SAIJA – Univ. ME

“Nanomateriali: applicazioni nell’impiego di nutraceutici e fitoterapici”

h. 18,00 ***Chiusura dei lavori della giornata***

MARTEDI’ 23 OTTOBRE

h. 9,30 – 11,00 ***Sessione “Interferenti Endocrini”***

Chairman: PROF. SALVATORE FASULO
 Univ. Messina

PROF.SSA MARIA MAISANO - Univ. ME

“Approcci tradizionali e moderni per valutare gli effetti degli interferenti endocrini in ambiente acquatico

PROF.SSA OLIANA CARNEVALI – Univ. AN

“Il problema degli EDS:l’orata e la sogliola come modelli sperimentali per lo studio della sicurezza alimentare ed ambientale”

PROF.SSA LAURA CANESI – Univ. GE

“Interferenti Endocrini: implicazioni per la salute umana e dell’ambiente”

DOTT.SSA FABIANA ARDUINI – II Univ. RM

“New biosensors for bpa detection”

PROF.SSA VINCENZA LAFORGIA – Univ. NA

“Effetti dei Distruttori Endocrini sull’asse ipotalamo-ipofisi-ghiandole surrenali/tiroide”

h. 11,00 Pausa

h. 11,30– 13,00 Sessione “OMICS: Epigenomica – Proteomica - Metabolomica”

Chairman: PROF. SSA RITA CASADIO
Univ. Bologna

PROF. SAVERIO BETTUZZI – Univ. PR

“Regolazione epigenetica di CLU nel cancro della prostata”

DOTT.SSA LAVINIA CASATI – Univ. MI

“Epigenoma, EDC ed Endocrinologia: una “tripla E” per un delicato Equilibrio”

DOTT.SSA ANGELA NEBBIOSO – II Univ. NA

“UVI5008: un triplo inibitore epigenetico con attività anti-cancro”

PROF.SSA MARGHERITA RUOPPOLO – Univ. NA

“La metabolomica nello studio degli errori congeniti del metabolismo”

DOTT. MARCO BIGLIETTO - AB SCIEX

“Pushing the Limits in Mass Spectrometry”

h. 13,00 Pausa

h. 14,30 – 16,00 Sessione “Nutraceutica”

Chairman: PROF. ETTORE NOVELLINO
Univ. Napoli “Federico II”

PROF.SSA ANNALISA ROMANI – Univ. FI

"Analisi e produzione industriali di frazioni polifenoliche standardizzate ad uso food "

PROF.SSA FLAVIA FRANCONI – Univ. SS

“Biophenols and gender”

PROF.SSA MARIA MARINO – Univ. RM3

“Regolazione dei segnali cellulari da molecole nutrizionali: il meccanismo di azione dei flavonoidi”

DOTT.SSA FEDERICA RIZZI – Univ. PR

“Attività chemiopreventiva delle catechine del tè verde nel cancro della prostata”

PROF. ALDO RODA – Univ. BO

“Nutraceutici: da coadiuvanti a farmaci. *L'importanza degli studi preclinici per la valutazione della tossicità e attività: caso-studio della Berberina*”

h. 16,00 Chiusura del Convegno

RELAZIONE INTRODUTTIVA

E' la prima volta, dopo le tante relazioni da me tenute in occasione dell' apertura dei nostri incontri nazionali, che mi accingo a relazionare, al contrario delle altre volte, con una vena di profondo pessimismo, in forte contrasto con il mio stesso carattere. E come non essere pessimisti se si ha la sensazione, ma non solo la sensazione, di operare in un ambiente disastroso persino moralmente? Siamo in crisi non solo come Consorzi Interuniversitari ma anche, e soprattutto, come singoli Ricercatori in quanto ci rendiamo sempre più conto che la maggior parte dei politici e di coloro che comunque decidono le sorti della ricerca sembrano non credere più quanto sia vantaggioso investire nella ricerca. Siamo alla vigilia di nuove elezioni politiche e tutti speriamo in un positivo cambiamento, ma la situazione sembra quella descritta dal venditore di almanacchi di Giacomo Leopardi. Ci sarà il cambiamento? Ogni venti anni, in Italia, c'è una crisi che comporta cambiamenti radicali nella politica e conseguente scompaginamento delle classi dirigenti. Così abbiamo avuto il fascismo, la resistenza, il sessantotto, mani pulite, ed ora siamo agli scandali delle regioni. I tempi sembrano maturi per il cambiamento. Ci saranno cambiamenti e prospettive di crescita anche per il mondo della ricerca? Vogliamo avere un atteggiamento non di parte politica in questa relazione, ma non possiamo non evidenziare la circostanza che chiunque sia stato al Governo, destra o sinistra, non ha fatto altro che tradire le promesse elettorali di un aumento degli investimenti per l'Università e Ricerca, investimenti ritenuti indispensabili nella fase elettorale dal momento che solo investendo in Ricerca ed Innovazione si può concorrere allo sviluppo economico e sociale del paese. Belle promesse pre-elettorali, puntualmente tradite in un'Italia che vive alla giornata. La nostra comunità scientifica ha una sola certezza: i tagli sicuri ai fondi destinati all'Università e Ricerca. Sono i tagli più facili da fare perché interessano una collettività poco efficace nelle pressioni sociali della propria protesta. Ne parlano per poco tempo i giornali per esclusiva strumentazione politica, ma nessuno fa vere e proprie campagne di sostegno per la Ricerca. E' vero che tutte le Nazioni sono state travolte da una crisi economica di carattere mondiale e che non siamo ancora usciti da questa crisi, ma nessun grande paese industrializzato ha ridotto i fondi per l'Università e la Ricerca. Da noi invece si è tagliato, ma tagliare lì dove l'investimento è ed è stato storicamente piccolo, significa ridurre ancor di più la linfa vitale a quel soggetto e quindi condannarlo ad una morte lenta e sicura. A volte mi chiedo: ma i ricercatori e la ricerca sono veramente un lusso per il paese? E' chiaro che si tratta di una domanda retorica: non siamo un lusso, non siamo dei fannulloni, certamente siamo dei privilegiati. Sicuramente sono privilegiati coloro che, avendo raggiunto posizioni di stabilità lavorativa e di riconosciuto valore scientifico, sono liberi di lavorare su quel che li gratifica e sono motivati esclusivamente dalla curiosità e dal desiderio della conoscenza. Ma dietro questi privilegiati quanti frustrati, quanti precari, bravi ma precari! Il mondo della ricerca, probabilmente, è l'unico settore lavorativo in cui il numero dei precari è paragonabile, se non superiore, al numero degli occupati stabilmente. Così non va, così non può andare! Bisogna cambiare, ma cambiare in positivo. L'Università, la Ricerca e l'Innovazione sono una ricchezza fondamentale per l'Italia: devono e dovranno sempre viaggiare affiancate. Scrive Indur M. Goklany che «L'età della pietra non finì perché l'uomo rimase senza pietre e l'età del ferro non finì perché rimase senza ferro ... Finirono perché l'uomo seppe escogitare qualcosa di nuovo, di meglio...». E questo è il potere della Ricerca e dell'Innovazione. Per tornare ad essere uno strumento davvero efficace di crescita sociale, il mondo della ricerca deve però saper cogliere la richiesta di rinnovarsi, dimostrando la capacità di raggiungimento di risultati precisi e tangibili e di poter essere protagonista nel progettare un futuro ambizioso, interagendo anche, e soprattutto, con il mondo delle Imprese.

Partendo da queste osservazioni generali mi riesce difficile separare il discorso sull'Università, la Ricerca e l'innovazione da quello sull'INBB, per cui farò prima delle riflessioni sulla ricerca italiana nel contesto europeo, sfiorando il confronto con i grandi paesi investitori come Stati Uniti, Cina e Giappone, poi riserverò qualche osservazione, come doveroso, sul sistema dei Consorzi Interuniversitari.

Venendo alla ricerca ed agli investimenti governativi ad essa riferiti possiamo osservare che è possibile dividere la graduatoria dei paesi europei in quattro gruppi. Al primo gruppo appartengono Svezia, Danimarca, Germania e Finlandia, paesi dove si è raggiunto l'obiettivo del 3% del PIL per gli investimenti in ricerca, sviluppo e innovazione a fronte di una media UE che è sotto il 2%. Il secondo gruppo, è formato, nell'ordine, da Belgio, Gran Bretagna, Olanda, Austria, Lussemburgo, Irlanda, Francia, Slovenia, Cipro ed Estonia, tutti paesi con un grado di innovazione "vicino" alla media UE. L'Italia guida il terzo gruppo che include Portogallo, Repubblica Ceca, Spagna, Ungheria, Grecia, Malta, Slovacchia e Polonia. In questo caso, il livello di innovazione e di investimenti è sotto la media UE. Al quarto gruppo appartengono invece Romania, Lituania e Lettonia le cui performance sono molto più bassa della media europea. Considerando l'Europa e non la comunità europea, il leader indiscusso è la Svizzera, come vedremo fra poco. Se ci paragoniamo con Germania, Regno Unito, Olanda, Francia, Spagna e Svizzera vengono fuori i dati riportati in Tabella. I dati si riferiscono al numero delle pubblicazioni scientifiche, che comunque sono un parametro da valutare. La posizione è relativa alla classifica mondiale. Nel formulare la tabella ho seguito lo spunto delle indicazioni, solo parte, provenienti dall'articolo "Is Italian Science declining? " Pubblicato da Cinzia Daraio e Henk F. Moed su Research Policy (Volume 40, Dicembre 2011, Pagine 1380-1392). La tabella qui riportata, però, è stata elaborata con dati relativamente più aggiornati dal momento che fanno riferimento a quanto attualmente riportato da SCImago un'agenzia di "ranking scientifico" che elabora dei veri e propri "Country Rankings" basati sui dati di Scopus. Il periodo sotto osservazione è 1996-2010. Mi limiterò ad osservare due parametri: il numero delle pubblicazioni ed il numero delle collaborazioni internazionali risultanti dai lavori. Prima di entrare nel dettaglio europeo diciamo subito che l'Italia si piazza all'ottavo posto della classifica mondiale dietro Stati Uniti, Cina, Regno Unito, Giappone, Germania, Francia, Canada e davanti a Spagna ed India. Ci siamo fermati ai primi 10 posti.

Nazione	Posizione Classifica mondiale	Pubblicazioni nel 1996	Pubblicazioni nel 2010	Velocità di crescita media n° pubblicazioni per anno	Media delle collaborazioni internazionali ultimi tre anni (%)	Contributo percentuale medio pubblicazioni ultimo triennio (%)	
						Mondo	Europa
Regno Unito	3	75.665	123.756	3.206	45	23.0	6.3
Germania	5	70.623	130.031	3.960	47	20.8	5.7
Francia	6	51.109	87.430	2.421	47	15.6	4.3
ITALIA	8	36.847	73.562	2.447	41	12.4	3.4
Spagna	9	22.982	64.985	2.800	40	10.5	2.9
Olanda	13	21.858	43.214	1.424	51	7.0	1.9
Svizzera	16	14.812	30.866	1.070	63.3	5.0	1.4

Guardando ai dati in tabella, che esprimono valori assoluti, vien da dire che l'Italia non sfigura rispetto alla media europea, ma questa conclusione non rende completa giustizia all'Italia perché la tabella non tiene conto di altri parametri normalizzatori, quali i fondi investiti, il numero dei ricercatori, la produttività per ricercatore, ossia il numero di pubblicazioni per ricercatore. In questa analisi, tra l'altro, abbiamo dovuto per forza di cose ritenere le pubblicazioni tutte di egual valore in quanto sono tutte pubblicazioni presenti nel Science Citation Index e quindi con un impact factor. Molto positivi per l'Italia sono i risultati relativi alla velocità media di crescita del numero annuale di lavori pubblicati per anno, nonostante il diminuire dei finanziamenti statali e la media delle collaborazioni internazionali (pubblicazioni con coautori italiani e stranieri) significativa della utilità internazionale della collaborazione italiana.

Guardiamo adesso al numero dei ricercatori sempre nel periodo 1996-2007. Da questi dati risulta che la Germania con 282.063 ricercatori e la Francia con 204.484 ricercatori occupano il

quinto e sesto posto ed hanno un numero di ricercatori rispettivamente 3,5 volte e 2,5 volte maggiore di quello dell'Italia che, con i suoi 82.489 ricercatori, occupa il dodicesimo posto.

Le classifiche precedenti vengono rivoluzionate se si considera, e questo è il dato più significativo da prendere in considerazione, la produttività per ricercatore, precedentemente definita. Quando questo tipo di analisi viene applicata al periodo 1996-2007 (ma non cambia di molto se si estende ad oggi il momento di osservazione) l'Italia balza al terzo posto (7.3 pubblicazioni), dopo la Svizzera (primo posto con 8.3 pubblicazioni) e l'Olanda (secondo posto con 7.9 pubblicazioni). Il Regno Unito passa al quarto posto, mentre Germania, Francia e Spagna occupano, ex equo, il nono posto con 3.6 pubblicazioni per ricercatore. Questa ultima graduatoria è una gran bella soddisfazione per le nazioni europee dal momento che occupano le prime posizioni. Gli Stati Uniti che risultano al primo posto per investimenti, per pubblicazioni e per numero di ricercatori occupano solo il tredicesimo posto per pubblicazioni per ricercatore (2.7).

Tutti questi dati sono incoraggianti nel senso che rafforzano la nostra convinzione che i nostri ricercatori non sono dei fannulloni, anzi sono degli eroi se si considerano le difficoltà economiche in cui si trovano ad operare. Anche per questo la stragrande maggioranza dei ricercatori vuole che venga riconosciuta la meritocrazia e quindi chiede di essere giudicata. Questa osservazione ci porta dritti a parlare dell'ANVUR. Noi, dell'INBB, siamo stati sempre favorevoli alla valutazione, come risulta da tutte le nostre relazioni. Siamo stati tanto favorevoli che, pur non essendo obbligati, ci siamo spontaneamente sottoposti all'attuale valutazione per il periodo (2004-2010) addirittura pagando un contributo di 20.000 Euro, un vero e proprio auto-salasso volontario in una epoca di crisi economica per le nostre casse. L'unica cosa che vogliamo è che la valutazione abbia un seguito reale e non sia un esercizio inutile: i buoni devono essere incentivati, i meno buoni non premiati.

Ritornando al riconoscimento del merito due parole sui prossimi concorsi interuniversitari, sia di prima che di seconda fascia. Già ci siamo espressi favorevolmente sui giudizi di idoneità in quando con l'idoneità non si dovrebbero sacrificare colleghi bravi in favore di situazioni clientelari (!). Il problema sarà successivo: nelle chiamate le idoneità "non protette" saranno discriminate rispetto alle "chiamate protette"? E qui è difficile fare previsioni o presentare suggerimenti. Per ora ci dichiariamo, come moltissimi colleghi, molto perplessi sui criteri delle definizioni delle mediane e ci dispiacerebbe molto se i vari ricorsi allungassero i tempi di una soluzione da tempo attesa.

Ma torniamo ai Consorzi Interuniversitari ed in particolare all'INBB.

Le nere avvisaglie economiche avvertite l'anno scorso si sono concretizzate quest'anno al momento della formulazione del FFO da parte del Ministro. Mentre l'FFO per l'Università veniva tagliato del 4%, il contributo FFO per i consorzi interuniversitari di ricerca tematica veniva tagliato del 34% passando da 4,5 milioni di euro a 3 milioni di euro: una vera e propria batosta. Il coordinamento dei Consorzi ha protestato, ha tenuto incontri di lavoro, ha elaborato documenti, ma tutto invano. L'unico risultato è stato un incontro con il Ministro, dopo ben tre interpellanze parlamentari da parte dell'Onorevole Tocci, del Senatore Valditara e della Senatrice Coscioni. L'incontro è stata una completa delusione sia perché è stato un monologo, nessuna apertura al confronto, anzi l'osservazione che ci saremmo potuti risparmiare la valutazione dell'ANVUR. Incredibile! Molti consorzi hanno dovuto raschiare il fondo del barile pur di farsi valutare e far emergere il loro valore scientifico ed il loro contributo positivo alla rete scientifica italiana ed alle Università. In risposta a questo il Ministro ci ha quasi accusato dicendo che avremmo potuto fare a meno di sottometterci al giudizio dell'ANVUR: Eppure c'erano stati incontri al Ministero tra i Consorzi e l'ANVUR per i criteri di valutazione dei consorzi. Evidentemente la mano destra ministeriale non sapeva quello che faceva la mano sinistra. Un risultato positivo ottenuto dalle trattative è che dovevamo trasmettere alle Università federate l'ammontare delle somme gestite per conto dei loro ricercatori: una nostra battaglia da anni che aveva lo scopo di abbassare il livello di tensione nei rapporti tra Consorzi interuniversitari ed Università. Questo è un nostro "punctum dolens": non riusciamo a far capire i vantaggi che i Consorzi Interuniversitari procurano alle università. Noi siamo degli alleati loro ci vedono dei competitors. Mi viene un'idea:

organizziamo una conferenza Coordinamento dei Consorzi – Conferenza dei Rettori: Probabilmente riusciremo a capirci e a farci giudicare come “supporter” e non “competitor”!

Ma il lavoro dei Consorzi non è finito qui: abbiamo dovuto velocemente preparare la documentazione per applicare al FFO: anche qui senza regole chiare! Anche questo è stato un lavoro improbo, come laboriosa era stata anche la preparazione del documento di autovalutazione richiestoci dall’ANVUR. Tutto insieme e tutto nel periodo estivo! C’è stato tanto da lavorare istituzionalmente e l’INBB ha affrontato tutti questi impegni con diligenza ed enorme spirito di sacrificio. Un doveroso ringraziamento da parte mia a tutto lo staff amministrativo-gestionale.

E guardiamo ora specificatamente all’interno dell’INBB. Incominciamo dalle note positive per poi passare alle note negative.

Note positive:

- a) Indipendentemente da quella che sarà la quota di finanziamento ordinario del MIUR, per il 2012 il bilancio preventivo dell’INBB prevede un leggero incremento della quota fondi in entrata per attività di ricerca. Si tratta di un incremento piccolo, ma quel che conta è il segnale di inversione di tendenza, inversione che speriamo si rafforzi nei prossimi bilanci.
- b) E’ aumentato il numero degli aderenti e questo è senza dubbio il miglior riconoscimento dell’ottimo servizio offerto dalla nostra amministrazione ai nostri ricercatori.
- c) Sono aumentate le convenzioni e le collaborazioni con enti terzi, sia pubblici che privati, e con alcune Fondazioni.
- d) E’ aumentata l’attenzione per i laboratori Nazionali INBB: “Medicina di genere” (ad Osilo), “Cellule staminali” (a Bologna) e l’istituendo laboratorio “Interferenti endocrini” (a Napoli).

Note negative:

- a) Bisogna riattivare/riorganizzare le sezioni territoriali sia per annullare il distacco vertici/base e sia per maggiormente stimolare i colleghi a livello locale. Le continue comunicazioni via mail da parte dell’INBB non bastano più. I colleghi devono sentire la presenza fisica dell’INBB non solo a livello locale, ma anche a livello nazionale.
- b) Occorre stimolare di più i singoli aderenti ad applicare a tutti i bandi, nazionali, regionali ed internazionali, per progetti di ricerca convincendoli che l’aver a disposizione un network li aiuta e favorisce le Università di appartenenza, senza entrare in competizione con esse. Bisogna far crescere il numero dei colleghi che presentano come INBB progetti di ricerca, sia come coordinatori che come semplici unità operative. Non è possibile che la platea degli applicanti sia sempre la solita: dobbiamo raddoppiare le domande!
- c) Bisogna riprendere a combattere per riprenderci quello che ci è stato tolto nell’ultimo anno e cioè la possibilità di coordinare, da appartenenti ai Consorzi, progetti come Futuro in Ricerca e, perché no, anche i PRIN. A livello Europeo lo possiamo fare, non si capisce perché non lo si possa fare a livello nazionale.

Mi fermo qui perché essendo le note negative (ma costruttive) di numero inferiore a quelle positive, voglio passare dal pessimismo iniziale al mio solito ottimismo, ottimismo rafforzato dalla numerosa presenza di giovani in questo Convegno. Dobbiamo resistere anche per loro ed io, con il vostro conforto ed aiuto, sono pronto a resistere.

Grazie

Prof. Damiano Gustavo Mita

ABSTRACT
DELLE COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

Sessione
“Malattie Neurodegenerative”

REDOX REGULATION OF CELLULAR STRESS RESPONSE IN AGING AND NEURODEGENERATIVE DISORDERS: ROLE OF HORMESIS AND VITAGENES

Calabrese Vittorio, Cornelius Carolin, Trovato Salinaro Angela and Calabrese J. Edward

¹*Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Catania, Italy;* ²*Environmental Health Sciences Division, School of Public Health, University of Massachusetts, Amherst, MA, USA;*

Protein quality control is a critical feature of intracellular homeostasis¹. In addition, modulation of endogenous cellular defense mechanisms via the stress response signaling represents an innovative approach to therapeutic intervention in diseases causing chronic tissue damage, such as neurodegeneration and cancer¹. Protein thiols play a key role in redox sensing, and regulation of cellular redox state is crucial mediator of multiple metabolic, signalling and transcriptional processes. Under optimal conditions long-term health protection is accomplished by protein homeostasis, a highly complex network of molecular interactions that balances protein biosynthesis, folding, translocation, assembly/disassembly, and clearance^{2,3}. Efficient functioning of maintenance and repair processes is crucial for both survival and physical quality of life. This is accomplished by a complex network of the so-called longevity assurance processes, which are composed of several genes termed vitagenes⁴⁻⁸. The term vitagenes refers to a group of genes which are strictly involved in preserving cellular homeostasis during stressful conditions. The vitagene family is actually composed of the heat shock proteins (Hsp) Hsp32, Hsp70, the thioredoxin system and the sirtuin system⁹. Dietary antioxidants, such as polyphenols and L-carnitine/acetyl-L-carnitine, have recently been demonstrated in vitro to be neuroprotective through the activation of hormetic pathways, including vitagenes¹⁰⁻¹². Over the past decade there has been a remarkable increase of interest in hormesis as a result of more significance being given to low dose effects and the use of more powerful study designs which have enabled to identify rational approaches to detect hormetic biphasic dose responses in the low dose zone. The hormetic dose-response, challenging long-standing beliefs about the nature of the dose-response in a lowdose zone, has the potential to affect significantly the design of pre-clinical studies and clinical trials as well as strategies for optimal patient dosing in the treatment of numerous diseases, including oxidant disorders. Given the broad cytoprotective properties of the heat shock response there is now strong interest in discovering and developing pharmacological agents capable of inducing stress responses. We have recently focused our research on the role of acetylcarnitine in the defense mechanisms against cellular stress and neurodegeneration. In addition, with a redox proteomics approach, we identified mitochondrial oxidatively modified proteins as a function of brain aging, specifically in those brain regions, such as cortex and hippocampus, that are commonly affected by the aging process. In all brain regions examined, many of the identified proteins were energy-related, such as pyruvate kinase, ATP synthase, aldolase, creatine kinase, and a-enolase. These alterations were associated with increased expression of Hsps, as well as carnosinase and thioredoxin reductase and with significant changes in both cytosolic and mitochondrial redox status in all brain regions analyzed. This findings are relevant to potential pharmacological interventions in healthy medicine strategy, pointing to maximize cellular stress resistance of the brain thus providing neuroprotection⁹⁻¹², and will be extended to other systemic oxidant disorders such as diabetes and cancer.

References:

- ¹Halliwell B. (2008) *Arch Bioch Biophys* 476:107;
- ²Calabrese V. (2007) *Nature Neurosci* 8,766;
- ³Calabrese V. (2011) *Mol Aspects of Med.* 32:279.
- ⁴Calabrese V. (2011) *Chem Biol.* 18:1355.
- ⁵Calabrese V. (2011) *Mol Aspects of Med.* 32:258.
- ⁶Calabrese V. (2012) *BBA* 1822:75388.
- ⁷Calabrese V. (2010) *Antiox Redox Signal* 13:1763;
- ⁸Calabrese V. (2010) *Neurochem Res* 35:1880;
- ⁹Calabrese EJ (2012) *Biogerontology* epub;
- ¹⁰Calabrese EJ (2010) *HET* 29:980;
- ¹¹Calabrese V. (2012) *BBA* 1822:729;
- ¹²Mattson MP. (2010) *Neuron* 67:900;

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI SOSTANZE NEUROPROTETTIVE NELLE INTERAZIONI FRA MICROGLIA E NEURONI

Antonio Contestabile

Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie, Università di Bologna

Lo studio delle interazioni fra microglia e neuroni ha messo in luce aspetti che hanno in buona parte modificato la concezione delle cellule della microglia come “spazzini” del sistema nervoso centrale. Di conseguenza, l’insorgere di stati di neuroinfiammazione non viene più solo visto come una condizione di aggravamento delle patologie neurodegenerative ma anche come un potenziale target di immunomodulazione della microglia e di stimolazione delle sue intrinseche proprietà neuroprotettive. Nel corso degli ultimi 15 anni numerosi dati sperimentali hanno supportato l’idea che le proprietà neuroprotettive della microglia si realizzino attraverso la produzione ed il rilascio di specifiche molecole che esercitano un ruolo benefico sulla sopravvivenza dei neuroni. Da alcuni anni nel nostro laboratorio questa tematica di ricerca viene affrontata in semplici modelli in vitro utilizzando co-culture di neuroni e microglia o testando gli effetti di terreni condizionati con l’uno o l’altro tipo cellulare. In particolare, gli esperimenti vengono condotti utilizzando colture di cellule dei granuli cerebellari come modello neuronale e colture altamente arricchite in cellule microgliari a partire da colture miste di corteccia cerebrale preparate da ratti neonati. Il terreno condizionato per 24-48 ore da cellule microgliari possiede costitutivamente proprietà neuroprotettive verso diversi tipi di morte indotta nei neuroni (shift della coltura a basso potassio, eccitotossicità da glutammato, esposizione alla neurotossina, 6-idrossidopamina). Utilizzando quest’ultima modalità di morte neuronale, abbiamo di recente identificato nel terreno condizionato dalla microglia tre proteine costitutivamente prodotte ed il cui rilascio viene variamente modulato dallo stato di attivazione della microglia che risultano neuroprotettive: transforming growth factor-beta2, superoxide dismutase 1 e apolipoproteina E. I dati sperimentali fino ad ora ottenuti riguardano a queste tre proteine neuroprotettive rilasciate dalla microglia verranno presentati e discussi nella relazione.

UNRAVELING THE BENEFICIAL EFFECTS OF OLEUROPEIN AGLYCONE AGAINST ALZHEIMER'S DISEASE

Massimo Stefani e Stefania Rigacci

Department of Biochemical Sciences, University of Florence

The presence, in several brain areas, of plaque deposits whose main component is a fibrillar mesh of the β -amyloid(1-42) (A β 42) peptide results in functional and cognitive alterations characterizing Alzheimer's disease (AD). Plaque load results from complex equilibria between A β deposition and clearance, where autophagy, a lysosome-mediated catabolic pathway responsible for turnover of long-lived proteins and organelles, notably mitochondria, appears to perform a key role. Autophagy protects neurons against A β -induced cytotoxicity suggesting its possible role in A β clearance; moreover, autophagy is protective, among others, against ageing, neurodegeneration and cancer, and the induction of autophagy by reduced caloric intake or by rapamycin in mouse models of AD results in decreased intraneuronal accumulation of A β , decreased brain levels of pathogenic A β 42 and a reduced age-dependent accumulation of phosphorylated and aggregated tau. Presently, the early pre-fibrillar assemblies of the A β peptides appearing at the onset of fibril growth are considered the main players of amyloid toxicity to neurons; accordingly, one of the directions of the research in AD therapy is developing molecules able to avoid the appearance of toxic oligomeric intermediates.

Focusing dietary regimens associated with a reduced risk of AD in the aged population can be useful to find out molecules exploitable for AD therapy. Mounting evidence supports the beneficial effects of the Mediterranean diet (MD) in preventing age-related dysfunctions, cancer and cardiovascular events; MD also reduces the risk and incidence of stroke, cerebrovascular and neurodegenerative diseases and attenuates AD-like pathology and cognitive deterioration. In particular, MD appears to be effective against mild cognitive impairment, which commonly precedes the appearance of severe AD symptoms, and its conversion to AD. Studies in rodents suggest that diet supplementation with polyphenols present in major components of the MD such as red wine and extra virgin olive oil (EVOO) improves learning and behavioural deficits associated with aging and disease. Several reports, including the "Three city study" support a strict association between many protective effects of the MD and the sustained assumption of extra virgin olive oil (EVOO). In particular, a number of polyphenols and secoiridoids found in EVOO, including oleocanthal, hydroxytyrosol and oleuropein aglycone (OLE) have been considered potentially responsible for the beneficial effect of MD, also taking into account their demonstrated ability to cross the blood-brain barrier.

Here it is reported that oleuropein aglycone (OLE), the main polyphenol found in EVOO protects the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease reducing significantly transgene-associated behavioral impairment. Tg mice fed for two months with a 5% fat diet supplemented with OLE (50 mg/kg of diet) displayed increased body weight and a better general condition without behavioral alterations including hyperactivity. More importantly, they got significantly better scores in learning and memory tests such as the step-down avoidance and the object recognition tests with respect to their littermates fed without OLE, reaching the same level of w.t. mice. Optimal protection was found when OLE supplementation was started at one month of age, when mice brain parenchyma still lacks evident plaque deposition in this animal model, whereas it was increasingly reduced with the delay of the onset of treatment. Data obtained with cultured cells and immunohistochemical analysis of cortical tissue in OLE-fed mice showed a remarkable reduction of both size and compactness of plaques, which appeared "fluffy". Finally, OLE-fed mice brain displayed reduced astrocyte reaction, oxidative stress and apoptosis. However, the most striking effect of OLE supplementation both in Tg and in w.y. mice, as well as in cultured cells, was a strong increase of

the expression of autophagy markers, possibly resulting from mTOR inhibition, together with a remarkable enhancement of the lysosomal pathway of protein degradation. Overall, our behavioral, histochemical and biochemical data support the importance of OLE, or one of its derivatives arising from tissue metabolism, as a key player of the reported beneficial effects of the Mediterranean diet against neurodegeneration and AD.

Sessione
“Nanobiotechnologie”

SCAFFOLD BIOMIMETICI COSTITUITI DA NANOFIBRE POLIMERICHE PER L'INGEGNERIA DEI TESSUTI

Maria Letizia Focarete

Dipartimento di Chimica "G. Ciamician"

CIRI Scienze della vita e tecnologie per la salute – Unità Medicina Traslazionale - Università di Bologna

via Selmi 2, 40126 Bologna, Italia

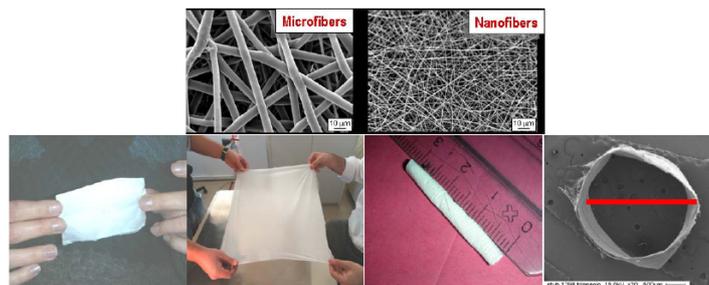
tel +39-0512099572, fax +39-051-2099456

marialetizia.focarete@unibo.it

Lo sviluppo di scaffold polimerici artificiali per l'ingegneria dei tessuti è un importante settore di ricerca nell'ambito della medicina rigenerativa.

Nei tessuti biologici, *in vivo*, le cellule sono circondate e supportate dalla matrice extracellulare (ECM), una complessa struttura fibrillare che è tipicamente organizzata su scala nanometrica. I recenti progressi nello sviluppo delle nanotecnologie hanno consentito di sviluppare scaffold costituiti da nanofibre polimeriche, biomimetici della ECM, che hanno un ruolo cruciale nel controllare molte funzioni cellulari. Le caratteristiche biomimetiche degli scaffold possono infatti giocare un ruolo fondamentale come guida nella rigenerazione dei tessuti biologici ed è stato dimostrato che la topografia delle nanofibre, indipendentemente dalla composizione del materiale polimerico, può influenzare alcuni comportamenti cellulari come l'adesione, la migrazione guidata e l'allineamento cellulare, la proliferazione, la produzione di ECM e il differenziamento [1-5].

Per ottenere scaffold nanofibrosi, con diametri simili a quelli delle fibre dell'ECM (compresi tra i 50 nm e i 500 nm) e con le caratteristiche morfologiche della ECM su scala nanometrica, una tecnica utile è rappresentata dall'elettrofilatura [6]. L'elettrofilatura è una tecnica semplice ed economica caratterizzata da una grande versatilità che consente di ottenere nanofibre polimeriche continue per la produzione di scaffold polimerici partendo sia da polimeri di origine naturale che da polimeri di sintesi. Mediante tale tecnica è possibile fabbricare scaffold di varie forme e dimensioni (vedi Figura) con fibre disposte in maniera casuale oppure orientate secondo disposizioni desiderate.



Questa presentazione illustrerà la fabbricazione e l'applicazione degli scaffold nanofibrosi mediante la tecnologia dell'elettrofilatura. Verranno mostrate le potenzialità di questa tecnologia che consente di produrre materiali con un'ampia gamma di proprietà chimico-fisiche e meccaniche, per applicazioni nel settore della medicina rigenerativa.

Un aspetto molto interessante è rappresentato dalla facilità con la quale è possibile controllare e modulare l'architettura degli scaffold su scala nano/micrometrica, in termini di diametri delle fibre, porosità superficiale delle fibre e loro orientazione, agendo sui parametri di processo. Un ulteriore vantaggio è dato dalla possibilità di incorporare nelle fibre agenti bioattivi o farmaci (come antibiotici, agenti antitumorali, proteine, ecc.) e dalla possibilità di funzionalizzare le nanofibre con molecole di interesse biologico [7]. Anche sospensioni contenenti cellule viventi sono state elettrofilate con successo [8]. Questa tecnologia permette, infine, di ottenere scaffold ibridi o

compositi a partire da una molteplicità di materiali diversi mediante una co-elettrofilatura (ad esempio polimeri sintetici e naturali).

Questo contributo intende presentare una panoramica sulla ricerca “di frontiera” riguardante gli scaffold nanofibrosi ottenuti da elettrofilatura e mostrerà alcune delle attuali applicazioni sia nell’ambito della ricerca di base che a livello industriale, oltre alle potenzialità future di tali scaffold nel settore biomedicale.

Saranno infine mostrati, come esempio, recenti risultati ottenuti su due specifici argomenti di ricerca: (i) fabbricazione di scaffold ibridi mediante co-elettrofilatura di polimeri sintetici e naturali per la rigenerazione del tessuto cartilagineo e di tessuti all’interfaccia osso-cartilagine. La scelta di questa tipologia di scaffold è stata dettata dalla considerazione che, mentre i polimeri sintetici contribuiscono ad un miglioramento delle proprietà meccaniche dello scaffold, i polimeri naturali offrono un’ottima biocompatibilità e un’eccellente affinità con le cellule; (ii) utilizzo di scaffold 2D e 3D come supporto di coltura per cellule staminali embrionali di ratto (RESC), al fine di studiare l'effetto degli scaffold sulla sintesi di fattori trofici di crescita utili per la riparazione neurale. Si è dimostrato che la crescita, il differenziamento e le attività paracrine delle RESCs sono direttamente influenzate, in assenza di altri stimoli, da differenti microambienti creati da diversi tipi di scaffold. In particolare, RESCs che crescono su scaffold polimerici nanofibrosi mostrano una maggiore proliferazione, una maggiore produzione di nerve growth factor (NGF) e vascular endothelial growth factor (VEGF) rispetto alle condizioni standard in 2D.

Riferimenti

1. Pham, Q.P., U. Sharma, and A.G. Mikos, *Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: A review*. Tissue Engineering, 2006. **12**(5): p. 1197-1211.
2. Szentivanyi, A., et al., *Electrospun cellular microenvironments: Understanding controlled release and scaffold structure*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2011. **63**(4-5): p. 209-220.
3. Ma, Z.W., et al., *Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds*. Tissue Engineering, 2005. **11**(1-2): p. 101-109.
4. Nisbet, D.R., et al., *Review Paper: A Review of the Cellular Response on Electrospun Nanofibers for Tissue Engineering*. Journal of Biomaterials Applications, 2009. **24**(1): p. 7-29.
5. Holzwarth, J.M. and P.X. Ma, *Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2011. **32**(36): p. 9622-9629.
6. Greiner, A. and Wendorff, J.H., *Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers*. Angew. Chem. Int. Ed. 2007. **46**: p. 5670 – 5703.
7. Liang, D., B.S. Hsiao, and B. Chu, *Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2007. **59**(14): p. 1392-1412.
8. Stankus J.J., Guan J., Fujimoto K., Wagner W.R., *Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix*. Biomaterials, 2006. **27**(5): p. 735–744.

BIOMATERIALI NANOSTRUTTURATI A MATRICE POLIMERICA: NANOPARTICELLE, NANOCOMPOSITI E NANOTOPOGRAFIA

I. Armentano¹, E. Fortunati¹, S. Mattioli¹, N. Rescignano¹, J.M. Kenny¹

¹Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Ingegneria Civile e Ambientale,
Strada di Pentima Bassa 4, 05100 Terni

L'obiettivo fondamentale del presente lavoro è quello di descrivere le promettenti applicazioni di polimeri biodegradabili da risorse naturali, quali il poli(acidolattico) (PLA), nel settore dell'ingegneria dei tessuti mettendo in evidenza come la nanostrutturazione del polimero possa essere fondamentale per favorire e veicolare l'interazione con gli organismi viventi.

In questo lavoro intendiamo presentare la nostra attività di ricerca recente presso il Laboratorio di Scienza e Tecnologia dei Materiali di Terni sullo sviluppo e caratterizzazione di sistemi nanostrutturati a matrice di poli(acidolattico) [1-5]. Nello specifico nanoparticelle, nanocompositi multifunzionali e modifiche topografiche superficiali sono stati sviluppati a partire da matrici polimeriche biodegradabili a base di PLA ed analizzati in relazione alle proprietà del polimero ed alla risposta cellulare.

Nanoparticelle di PLA sono state realizzate con un preciso controllo della dimensione e della morfologia, utilizzando la tecnica della doppia emulsione allo scopo di incapsulare e veicolare agenti bioattivi macromolecolari, per una corretta e controllata consegna del farmaco al tessuto malato per il trattamento di varie patologie. Scaffold nanocompositi sono stati realizzati con diverse tecniche, miscelando le proprietà del PLA con specifiche nanostrutture funzionali (nanotubi di carbonio, nanoidrossiapatite, etc.), che possono trasferire al polimero biodegradabile proprietà uniche, mentre le proprietà superficiali sono state modificate utilizzando un plasma a radiofrequenza.

La possibilità di controllare le funzionalità delle cellule modulando le proprietà del polimero, rappresenta un punto chiave della scienza dei materiali e un punto di partenza importante nelle applicazioni dell'ingegneria tissutale.

Bibliografia

1. I. Armentano, M. Dottori, E. Fortunati, S. Mattioli, J.M. Kenny. *Pol Deg Stabil* 2010;95:2126-46.
2. S. Mattioli, JM Kenny and I Armentano. *J App Pol Sci*. Accepted 2012 DOI 10.1002/app.36827
3. F. D'Angelo, I. Armentano, I. Cacciotti, R. Tiribuzi, M. Quattrocchi, et al. *Biomacromolecules*, 2012, 13 (5), pp 1350–1360. DOI:10.1021/bm3000716.
4. N Rescignano, M Amelia, A Credi, JM Kenny and I Armentano *Morphological and thermal behaviour of porous biopolymeric nanoparticles*. *Eur Pol J* Accepted EPJ_EUROPOL-D-11-01115.
5. E. Lizundia, J. R. Sarasua F. D'angelo, S. Martino, A. Orlacchio, J. M Kenny, I. Armentano Accepted in *Macromolecular Bioscience* mabi.201200008.

SCAFFOLDS BIOCOMPATIBILI PER LA RIGENERAZIONE DEI NERVI

Mantovani Cristina¹, Procacci Patrizia², Castelnovo Luca Franco¹, Ferruti Paolo³, Ranucci Elisabetta³, Magnaghi Valerio¹

¹ Dip. Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Via G. Balzaretti 9

² Dip. Scienze Biomediche per la Salute, Via Colombo 71

³ Dip. di Chimica, Via Venezian 21

Università degli Studi di Milano

Il trattamento delle lesioni dei nervi periferici è tipicamente basato sulla riconnessione chirurgica diretta *end-to-end* del nervo danneggiato, sebbene la sutura di due monconi può riparare solo le resezioni nervose di dimensioni relativamente piccole. Per altre lesioni si predilige l'uso di innesti nervosi autologhi. Tuttavia, questo approccio chirurgico non è sufficientemente valido per lesioni dei nervi molto lunghe, in quanto le tensioni meccaniche al nervo potrebbero inibirne la rigenerazione.

Un approccio alternativo è basato sull'uso di condotti, che possono essere di diversa natura chimica, naturale o sintetica. Fra i nuovi biomateriali un approccio alternativo è basato sull'uso di condotti di idrogelo, con specifici diametri, a base poliammidoammidica (PAA). Oligomeri di PAA sono trasformati in "idrogel" per polimerizzazione radicale mediante attivazione termica. Se effettuato in uno stampo, questo processo può dare luogo a condotti di idrogelo di varie forme e dimensioni. Le PAA sono idrogel reticolati tipici, che in funzione del loro grado di reticolazione possono assorbire grandi quantità di acqua. Gli idrogeli di PAA non sono citotossici, sono biocompatibili e degradano *in vitro* in prodotti non tossici, a basso peso molecolare, in un periodo di tempo variabile da poche settimane a mesi. I risultati ottenuti *in vivo*, in un modello sperimentale di resezione del nervo sciatico del ratto, indicano che le lesioni nervose possono essere validamente rigenerate mediante l'utilizzo di un condotto (4 mm in lunghezza, 1 mm di diametro interno) di PAA a base di idrogelo. In questo modello sono state eseguite la valutazione della sensibilità nocicettiva e della funzionalità motoria, che a un mese dall'intervento chirurgico hanno indicato risultati promettenti nella deambulazione e nella trasmissione sensoriale del nervo rigenerato. L'analisi morfologica in microscopia ottica ed elettronica ha inoltre confermato la rigenerazione, dimostrando che a tempi più lunghi (6-9 mesi) si ha una rigenerazione pressoché completa del nervo.

Nell'insieme, i dati ottenuti sono alquanto promettenti per l'utilizzo di idrogeli a base di PAA come condotti efficaci per il trattamento e per la rigenerazione dei nervi lesionati. Allo scopo di migliorare ulteriormente le potenzialità rigenerative di tali supporti, sono in corso studi per la funzionalizzazione della matrice di idrogelo allo scopo di ottimizzarla per il *drug delivery* di farmaci (ad esempio fattori di crescita, ormoni e neuropeptidi), nonché per l'utilizzo di cellule staminali autologhe che possano sostituire e/o integrare le cellule periferiche danneggiate.

L'INTEGRAZIONE TRA LA BIOINFORMATICA E LA NANOTECNOLOGIE PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA

Carmelina Ruggiero

Università degli Studi di Genova

Negli ultimi 20 anni si sono verificati sviluppi molto significativi nelle nanotecnologie, in particolare applicate alla biologia e alla medicina e in bioinformatica.

Sono stati sviluppati molti metodi e tecniche di fabbricazione di nanostrutture organizzate, nanomateriali e strumenti per microscopia e spettroscopia a livello nanometrico. Alcuni esempi sono metodi litografici ad alta risoluzione, matrici di sensori per l'individuazione di biomolecole, microarray al DNA e alle proteine, quantum dots, nanoparticelle, liposomi e microcapsule polielettrolitiche per la somministrazione localizzata di farmaci.[1-3]

La bioinformatica ha ottenuto sviluppi recenti e molto significativi per quanto riguarda la genomica, proteomica, metabolomica e systems biology. Questi risultati sono spesso strettamente legati ad innovazioni nelle tecniche di fabbricazione.

Negli ultimi anni la convergenza tra la bioinformatica e la nanotecnologia si è ulteriormente rafforzata. Il grande aumento della quantità di dati di genomica e proteomica, le recenti scoperte nella delucidazione dei meccanismi molecolari di malattie, e il rapido sviluppo di nuove tecnologie per la diagnosi e la terapia a livello molecolare ha portato allo sviluppo di una nuova fase della medicina nella quale l'individuazione, la diagnosi e la terapia delle malattie vengono progettate seguendo il profilo molecolare ogni individuo (medicina personalizzata) [4, 5].

Inoltre gli sviluppi delle nanotecnologie hanno fornito l'opportunità di integrare informazione morfologica e molecolare e di mettere in relazione cambiamenti a livello molecolare e cellulare con caratteristiche di malattie [6]. Un esempio di integrazione della bioinformatica con la nanotecnologia è fornito dal progetto europeo Cardioworkbench [7].

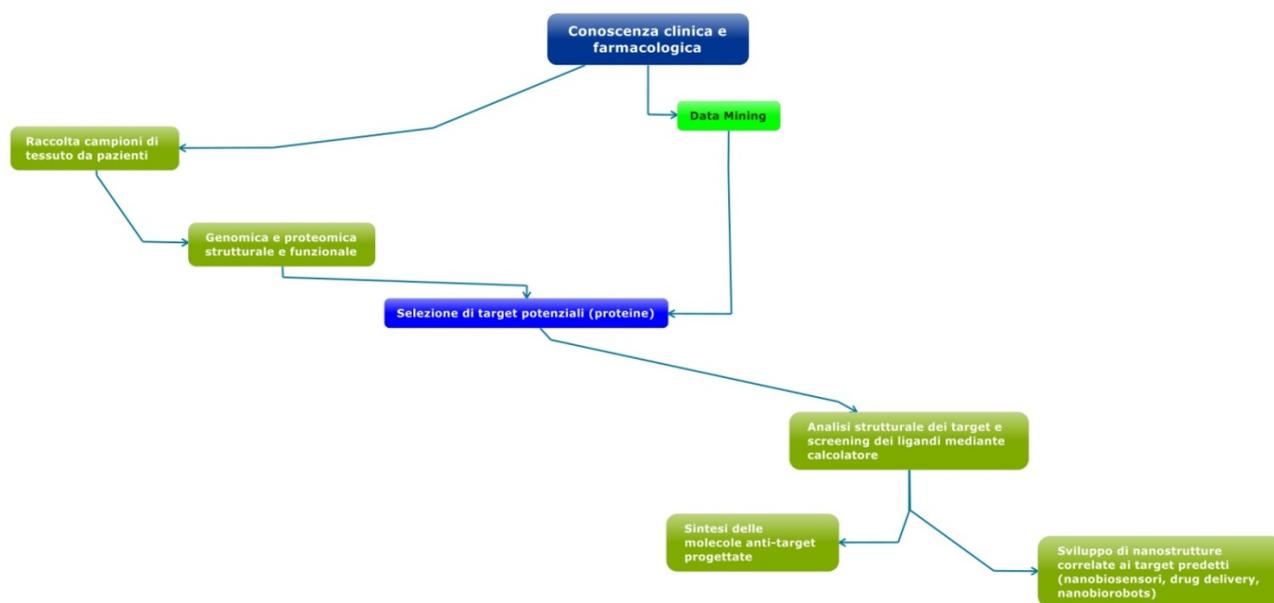


Figura 1. Workflow del progetto Cardioworkbench

Lo scopo di questo progetto è stato quello di scoprire nuovi fattori coinvolti nelle malattie cardiovascolari e istituire sistemi per selezionare e testare molecole che sono farmacologicamente attive per il loro trattamento. La prima fase critica del processo di sviluppo di un farmaco è l'identificazione e la convalida di bersagli farmacologici (ad esempio proteine, acidi nucleici) per applicazioni terapeutiche. L'identificazione di target dall'analisi mediante microarrays di dati di

espressione genica provenienti da campioni di cellule e tessuti estratti da pazienti è stato essenziale per la ricerca e la sintesi di nuove molecole bioattive che possono interagire con essi. Un target selezionato all'interno del progetto è stata la proteina Rac1, di cui si sono studiati alcuni possibili polimorfismi (figura 2)[8-11].

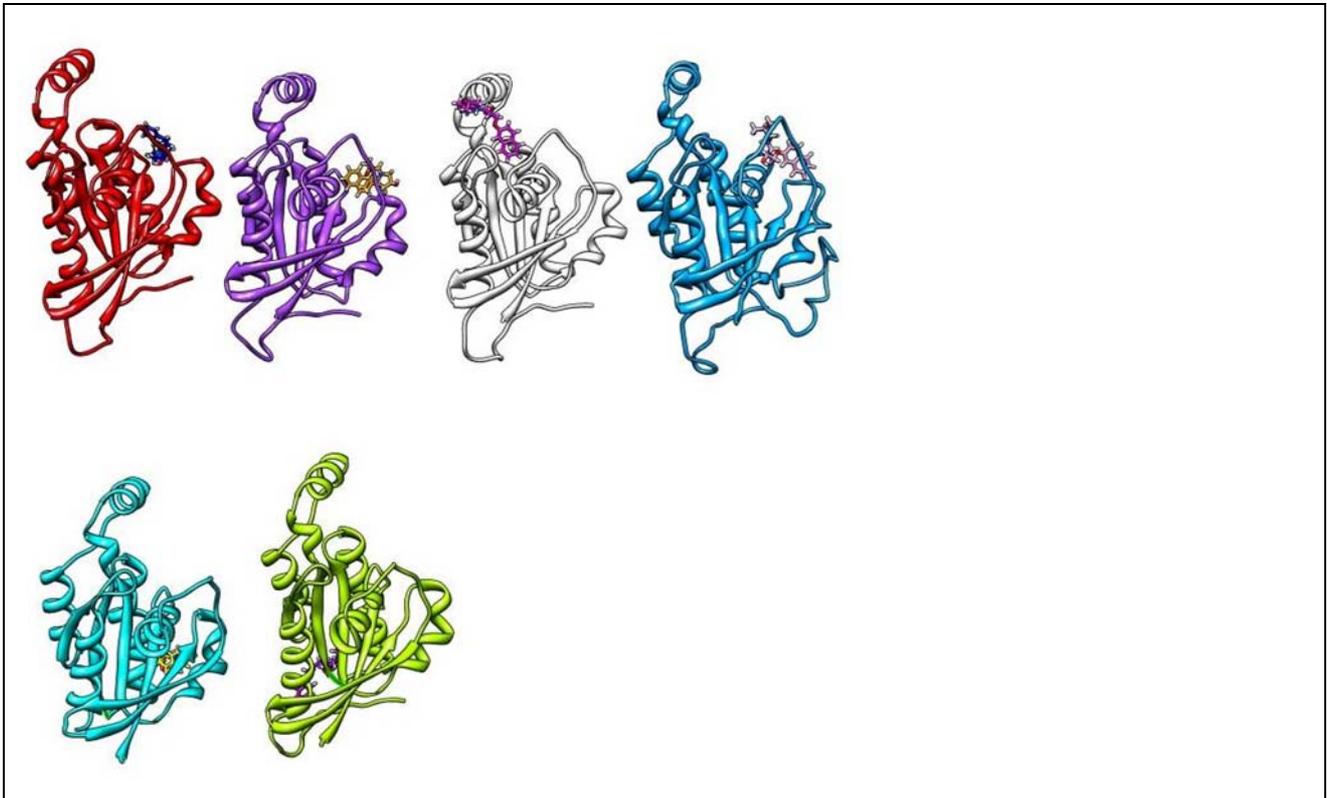


Figura 2. Polimorfismi della proteina Rac1 e differenti posizioni del ligando ZINC127562 nelle differenti strutture 3D

Futuri sviluppi del progetto saranno l'incapsulamento di farmaci all'interno di capsule polielettrolitiche e dendrimeri che possono venire utilizzate come vettori.[12-16]

- [1] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, and S. Weiss, "Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics," *Science*, vol. 307, pp. 538-544, January 28, 2005 2005.
- [2] H. M. E. Azzazy, M. M. H. Mansour, and S. C. Kazmierczak, "From diagnostics to therapy: Prospects of quantum dots," *Clinical Biochemistry*, vol. 40, pp. 917-927, 2007.
- [3] M. L. Immordino, F. Dosio, and L. Cattel, "Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential," *International journal of nanomedicine*, vol. 1, pp. 297-315, 2006.
- [4] K. K. Jain, "Personalized medicine," *Current opinion in molecular therapeutics*, vol. 4, pp. 548-558, 2002.
- [5] J. H. Phan, R. A. Moffitt, T. H. Stokes, J. Liu, A. N. Young, S. Nie, and M. D. Wang, "Convergence of biomarkers, bioinformatics and nanotechnology for individualized cancer treatment," *Trends in Biotechnology*, vol. 27, pp. 350-358, 2009.
- [6] S. Nie, Y. Xing, G. J. Kim, and J. W. Simons, "Nanotechnology applications in cancer," *Annu Rev Biomed Eng*, vol. 9, pp. 257-88, 2007.
- [7] N. M. P. Arrigo, M. Giacomini, M. Sturla, F. Caneva Soumetz, L. Pastorino, and C. Ruggiero, "A Genomics and Proteomics Based Approach to Pharmacotherapy for Cardiovascular Diseases," *IEEE Nanomed* 2007.

- [8] P. Arrigo, N. Maggi, and C. Ruggiero, "In silico screening of Rac1 ligand specificity," in *Engineering in Medicine and Biology Society, 2008. EMBS 2008. 30th Annual International Conference of the IEEE*, 2008, pp. 4098-4101.
- [9] N. Maggi, P. Arrigo, and C. Ruggiero, "SNP analysis of Rac1 For personalized ligand interaction," in *Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2010 Annual International Conference of the IEEE*, 2010, pp. 1779-1782.
- [10] N. Maggi, P. Arrigo, and C. Ruggiero, "Drug design for cardiovascular disease: The effect of solvation energy on Rac1-ligand interactions," in *Engineering in Medicine and Biology Society, EMBC, 2011 Annual International Conference of the IEEE*, 2011, pp. 3237-3240.
- [11] N. Maggi, P. Arrigo, and C. Ruggiero, "Comparative Analysis of Rac1 Binding Efficiency With Different Classes of Ligands: Morpholines, Flavonoids and Imidazoles," *NanoBioscience, IEEE Transactions on*, vol. 11, pp. 181-187, 2012.
- [12] L. Pastorino, S. Erokhina, F. C. Soumetz, P. Bianchini, O. Konovalov, A. Diaspro, C. Ruggiero, and V. Erokhin, "Collagen containing microcapsules: Smart containers for disease controlled therapy," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 357, pp. 56-62, 2011.
- [13] L. Pastorino, F. C. Soumetz, and C. Ruggiero, "Nanostructured thin films for the development of piezoelectric immunosensors," *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, vol. 2007, pp. 2257-60, 2007.
- [14] R. A. Petros and J. M. DeSimone, "Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 9, pp. 615-627, 2010.
- [15] U. Boas and P. M. H. Heegaard, "Dendrimers in drug research," *Chemical Society Reviews*, vol. 33, pp. 43-63, 2004.
- [16] N. Maggi, P. Arrigo, and C. Ruggiero, "In silico evaluation of nanoparticle cell interaction via human TLR3," in *Nanotechnology (IEEE-NANO), 2010 10th IEEE Conference on*, 2010, pp. 995-998.

NANOMATERIALI: APPLICAZIONI NELL'IMPIEGO DI NUTRACEUTICI E FITOTERAPICI

Antonella Saija

Dipartimento Farmaco-Biologico, Facoltà di Farmacia, Università di Messina

Esiste un gran numero di esempi di applicazioni di successo dei nanomateriali nel campo dei prodotti per la salute dell'uomo, tra cui i prodotti bioattivi di origine naturale.

Da una parte, il settore dei prodotti di origine naturale è oggi di sempre maggiore interesse sia per i ricercatori che per il pubblico; molti di questi prodotti sono allo studio per quanto riguarda i loro effetti benefici sulla salute dell'uomo, anche nei campi della prevenzione e/o della terapia di malattie a notevole impatto come il cancro e le patologie neurodegenerative.

Dall'altra parte le nanotecnologie sono un settore innovativo che ha aperto nuove prospettive nel campo delle scienze mediche, ma anche delle scienze nutrizionali. In questo caso la progettazione di nanomateriali dovrebbe essere intesa come lo studio di sistemi complessi in scala nanometrica ($\approx 1-100$ nm), formati da almeno due componenti, dei quali uno è una sostanza biologicamente attiva e l'altro può essere estremamente diverso nella sua natura chimica (includendo materiali di origine naturale, come albumina, gelatina e fosfolipidi, e non, come diversi polimeri, nanoparticelle contenenti metalli e nanotubi di carbonio). Le principali motivazioni che hanno spinto a vagliare l'utilità dell'impiego dei nanomateriali nel settore dei fitoterapici e dei prodotti nutraceutici sono che molti di questi prodotti sono idrofobici e hanno limitata biodisponibilità, spesso si comportano come agenti multifattoriali e possono comunque produrre effetti collaterali non desiderati. Da ciò si evince che, così come in quello della farmacoterapia propriamente detta, gli scopi della ricerca in questo campo includono: un più specifico drug targeting e delivery; il miglioramento della capacità di attraversamento delle barriere biologiche, anche selettive come la barriera emato-encefalica; la riduzione della tossicità del principio attivo a parità di effetto terapeutico; maggiore sicurezza e biocompatibilità. Inoltre, altri problemi di base in queste ricerche sono quelli stessi che rappresentano un prerequisito per lo sviluppo di nuove formulazioni, includendo: l'incorporazione ed il release del principio attivo; la stabilità e la shelf-life della formulazione; la biocompatibilità; la biodistribuzione; l'efficienza. Per fare un esempio, la curcumina è un principio attivo estremamente promettente per i suoi potenziali impieghi in diverse condizioni patologiche, come i tumori cerebrali e la malattia di Alzheimer. Infatti la curcumina ha molteplici attività biologiche, tra cui antiproliferative, antiangiogenetiche, antiossidanti e antinfiammatorie, in quanto capace di interagire a livello molecolare con punti chiave delle vie di segnale cellulare. Ma i potenziali impieghi di questo composto sono limitati appunto dalla sua ridotta biodisponibilità e idrofobicità; la veicolazione tramite nanomateriali può permettere di superare questi ostacoli, identificando così nuovi approcci imperniati su questo composti e finalizzati alla protezione e cura della salute dell'uomo.

Anche in questo campo di ricerca, non va dimenticato che i nanomateriali, proprio per le loro dimensioni, possono penetrare all'interno delle cellule e all'interno di vari compartimenti cellulari incluso il nucleo. C'è quindi un rischio, ancora sottodimensionato o almeno non compreso nella sua vera entità, per la potenziale capacità di tali sistemi di veicolazione di indurre essi stessi effetti tossici, che dipendono da numerosi fattori (composizione e purezza del materiale, dimensioni, forma, cristallinità, area della superficie, solubilità, stato di dispersione, caratteristiche chimiche superficiali). Inoltre, nel complesso, molto poco si sa sugli eventuali effetti collaterali e sulla tossicità a breve e lungo termine dei nanomateriali. Quindi particolare enfasi dovrebbe essere posta proprio sullo studio degli effetti tossici dei nanomateriali di per sé, nonché sulla necessità di realizzare approfonditi studi preclinici e clinici. Va sottolineato che studi in vitro su colture cellulari hanno confermato la significativa capacità di alcuni nanomateriali di produrre radicali e specie reattive dell'ossigeno che possono essere responsabili di danno cellulare. A proposito di ciò, un aspetto su cui investigare è l'utilizzazione di fitocomposti in associazione a e/o veicolati da

nanomateriali, fitocomposti i quali appunto per le loro proprietà antiossidanti e antinfiammatorie possono prevenire o diminuire gli effetti tossici dei nanomateriali.
In conclusione, alla luce della attuali conoscenze, l'uso dei nanomateriali nel settore dei nutraceutici e dei fitoterapici appare promettente, ma ulteriori studi sono certamente necessari per valutarne reale efficacia e sicurezza d'uso.

Sessione
“Interferenti Endocrini”

INTERFERENTI ENDOCRINI: IMPLICAZIONI PER LA SALUTE UMANA E DELL'AMBIENTE

Laura Canesi

DISTAV, Dipartimento di Scienze della Terra, dell'Ambiente e della Vita

Università di Genova

Corso Europa 26, 16132, Genova

Laura.Canesi@unige.it

La presenza e diffusione di diversi composti chimici che rappresentano Interferenti Endocrini (IE), riconosciuti o potenziali, nelle matrici ambientali, nel cibo e nei fluidi biologici umani costituisce un problema globale. Le implicazioni per la salute dell'uomo e dell'ambiente possono essere affrontate mediante diversi approcci. In questa sede verranno illustrate le attività del gruppo di Fisiologia Ambientale-Biomarker/Bioassays dell'Università di Genova nel campo dello studio della presenza di IE in matrici ambientali, dei meccanismi di azione a livello cellulare in modelli in vitro di cellule di mammifero, e del possibile impatto su organismi acquatici. In particolare, tale attività comprende: a) la valutazione, mediante l'E-SCREEN assay condotto su cellule umane, dell'attività estrogenica/antiestrogenica di composti puri, miscele complesse, e matrici ambientali, quali acqua potabile destinata al consumo umano, e acque provenienti da impianti di depurazione; b) lo studio degli effetti e dei meccanismi di azione di IE sull'omeostasi lipidica in cellule epatiche, in relazione al potenziale ruolo di IE nell'obesità e patologie correlate; c) l'impatto biologico di IE su invertebrati e vertebrati acquatici.

IL PROBLEMA DEGLI EDS: L'ORATA E LA SOGLIOLA COME MODELLI SPERIMENTALI PER LO STUDIO DELLA SICUREZZA ALIMENTARE ED AMBIENTALE

Oliana Carnevali

Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente

Università Politecnica delle Marche

o.carnevali@univpm.it

Negli ultimi anni la Commissione Europea ha posto grande attenzione alla determinazione degli effetti negativi dei distruttori endocrini ambientali (EDs). In questa cornice, la determinazione della presenza di interferenti endocrine mediante biomarkers consentirà di valutare l'impatto degli EDs sulla riproduzione e sul metabolismo degli organismi che vivono in aree inquinate e di ridurre i rischi sia per l'ambiente che per la salute umana.

L'uso di indicatori biologici rappresenta una recente strategia che tenta di semplificare gli studi di monitoraggio ambientale avvalendosi di "molecole spia" particolarmente sensibili a determinate sostanze inquinanti. Questo approccio consentirà di stabilire gli effetti degli EDs emergenti sulla riproduzione e sull'accrescimento delle specie ittiche e di individuare biomarkers per il monitoraggio della qualità dell'ambiente.

Nel corso di questo workshop saranno discussi risultati sugli effetti biologici di sedimenti contaminati e di inquinanti presenti nella colonna d'acqua in due specie di interesse commerciale la sogliola e l'orata. Sebbene i livelli di sostanze chimiche presenti nei sedimenti studiati erano al di sotto dei limiti consentiti dalla legge italiana, l'esposizione della sogliola (*Solea solea*) ad un sedimento (0,3%, w / v) per 96 h, ha rivelato cambiamenti biologici significativi suggerendo l'utilità di questa specie come biosensore. Inoltre, i risultati ottenuti hanno evidenziato che l'analisi chimica dei sedimenti, sebbene informativa, spesso non è indicativa degli effetti biologici che questi contaminanti possono causare sugli organismi acquatici residenti nell'area contaminata. La bio-tossicità dei sedimenti in studio è stata ulteriormente validata esponendo una specie pelagica l'orata (*Sparus aurata*).

Per evidenziare gli effetti biologici indotti da EDs presenti nei sedimenti, sono stati utilizzati microarray multi-specie (per specie acquatiche) e q-PCR; i risultati ottenuti in sogliola e orata suggeriscono che il sedimento definito come moderatamente contaminato, unicamente sulla base del profilo chimico, può causare effetti nocivi per gli organismi acquatici. Questo studio evidenzia la necessità di usare approcci biologici per stabilire i livelli di tossicità dei sedimenti e suggerisce che la classificazione del sedimento unicamente sulla base dei profili chimici specifici è insufficiente e non fornisce dati sull'effettivo potenziale del mix di inquinanti presenti nel sedimento. I nostri dati suggeriscono l'integrazione di analisi fisico-chimiche e biotest per un quadro più idoneo nel monitoraggio ambientale fornendo chiare indicazioni sugli effetti dannosi degli EDs sugli organismi acquatici.

Inoltre, nell'ambito del progetto Ricerca finalizzata 2009 (RF 2009 15 36185) ulteriori studi volti a stabilire l'effetto di inquinanti estradiolo simili (BPA, NP e OP), presenti in colonna d'acqua, sul metabolismo e sulla riproduzione di una importante specie commerciale, l'orata, sono attualmente in corso nei nostri laboratori, in collaborazione con l'Università di Genova. Questo approccio consentirà di identificare e validare biomarkers specifici per valutare l'impatto di contaminanti estrogeno simili sulla riproduzione e sul metabolismo, appetito / crescita di giovanili di orata.

Inoltre, in collaborazione con la Seconda Università di Napoli e l'Istituto Zooprofilattico del Mezzogiorno, saranno valutati la presenza e gli effetti di tali contaminanti sulla qualità delle carni. Nel loro insieme questi dati forniranno gli strumenti idonei per:

- La mappatura dei siti costieri contaminati da distruttori endocrini mediante l'uso di biomarker
- L'identificazione delle specie più vulnerabili e più colpite dalla presenza di distruttori endocrini
- La valutazione del rischio ambientale e per la salute umana

Ringraziamenti

Garry Hardiman e la Biomedical Genomics Facility

Al Dr Cataldo Ribecco, per il lavoro svolto sui sedimenti e la Dr Nozzi Valentina e la Dr Annalisa Scorolli, il Prof. G. Mita e Dr A. Mandich per la sperimentazione nell'ambito del progetto Ricerca finalizzata 2009 (RF 2009 15 36185).

Ricerca finalizzata 2009 (RF 2009 15 36185).

EFFETTI DEI DISTRUTTORI ENDOCRINI SULL'ASSE IPOTALAMO- IPOFISI-ADRENAL-TIROIDE NEI BASSI VERTEBRATI

Vincenza Laforgia, Rosaria Sciarrillo, Anna Capaldo, Salvatore Valiante, Maria De Falco.*

Dipartimento delle Scienze Biologiche - Università di Napoli Federico II

**Dipartimento delle Scienze per la Biologia, la Geologia e l'Ambiente - Università degli Studi del Sannio, Benevento*

Contaminanti chimici industriali e pesticidi possono interferire con il funzionamento del sistema endocrino in diverse specie animali, uomo compreso. Per questo tali composti sono chiamati distruttori o interferenti endocrini (Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs). Gli EDCs hanno carattere lipofilo e questo permette loro di diffondere attraverso la membrana cellulare, di legare eventualmente i recettori per gli ormoni steroidei e di accumularsi a livello del tessuto adiposo. Il loro bioaccumulo può avvenire non solo per effetto dell'inquinamento ambientale ma anche attraverso la catena alimentare. È stato dimostrato nei vertebrati non-mammiferi che l'esposizione ai pesticidi influenza l'attività delle ghiandole endocrine quali ghiandole adrenali, determinando un'alterazione della sintesi e secrezione degli ormoni steroidei e delle catecolammine; e tiroide inducendo alterazioni morfo-funzionali della ghiandola. Poiché la presenza degli EDCs è stata rilevata sia in habitat terrestre che acquatico, per le nostre ricerche abbiamo utilizzato esemplari di entrambi i sessi della lucertola *Podarcis sicula* e dell'anfibio *Triturus carnifex*, specie in grado di bioaccumulare e biomagnificare e pertanto validi bioindicatori.

I nostri studi hanno preso in considerazione i danni indotti da pesticidi (tiofanato metile) e alchilfenoli (nonilfenolo e octilfenolo singolarmente e in miscela) sulla ghiandola adrenale, generalmente poco studiata e sulla tiroide. Le indagini sono state condotte con tecniche istologiche sia in microscopia ottica che elettronica al fine di valutare le variazioni morfologiche delle due ghiandole in seguito a trattamento sperimentale. Negli stessi animali sono state valutate tramite HPLC le variazioni dei livelli plasmatici di adrenalina e noradrenalina e tramite metodiche radioimmunologiche le variazioni degli ormoni tiroidei, TSH, TRH e di corticosterone, ACTH, CRF. Le dosi utilizzate nei nostri esperimenti corrispondono alle dosi rilevate in natura o, per i pesticidi, a quelle utilizzate in agricoltura.

Tiofanato metile: nelle lucertole è stato osservato un decremento dei valori di ACTH tempo e dose dipendente ed un incremento del valore plasmatico del corticosterone. Inoltre si è verificato un incremento dell'adrenalina ed una diminuzione della noradrenalina. In accordo con i dati ormonali, morfologicamente è stato osservato un incremento del numero di cellule ad adrenalina, un aumento della vascolarizzazione ed una ipertrofia dei cordoni steroidogenetici; dopo 30 giorni di trattamento si è verificata una notevole infiltrazione di macrofagi nelle ghiandole adrenali, indice di sofferenza. I dati ormonali riscontrati suggeriscono che il tiofanato metile agisce direttamente sulle ghiandole adrenali mimando l'azione dell'ACTH endogeno e stimolando la sintesi e il rilascio di corticosterone. Quest'ormone, a sua volta, per effetto di un meccanismo di feedback negativo agisce sull'asse ipotalamo-ipofisi-adrenale facendo diminuire il rilascio di ACTH e stimolando, in modo paracrino, la metilazione della noradrenalina in adrenalina. Lo stesso tipo di risultati, relativamente alle catecolammine, è stato riscontrato in un analogo trattamento effettuato sull'anfibio *Triturus carnifex*; al contrario si è verificata una inibizione della sintesi e del rilascio degli steroidi. È stato dimostrato che il tiofanato metile nel rettile *Podarcis* determina un decremento degli ormoni tiroidei ma non del TSH, ed evidenti segni di inibizione dei follicoli tiroidei.

Alchilfenoli: Sono stati valutati gli effetti di nonilfenolo e octilfenolo sia singolarmente che in miscela sulle ghiandole adrenali e sulla tiroide di *Podarcis sicula*. In tutti i trattamenti si è evidenziato un effetto stimolatorio degli alchilfenoli sull'asse ipotalamo/ipofisi/surrene con un incremento dei valori di CRF, ACTH, corticosterone ed adrenalina ma con una notevole diminuzione dei valori plasmatici di noradrenalina. Questo fa pensare ad una azione diretta sull'ipotalamo che a sua volta stimola la secrezione di ACTH ipofisario determinando un

incremento della secrezione di corticosterone. Questa cascata di eventi si riflette sull'incremento della trasformazione della noradrenalina in adrenalina ad opera dell'enzima PNMT che viene stimolato dal corticosterone. Morfologicamente c'è un incremento delle cellule ad adrenalina che a fine trattamento appaiono completamente degranulate, segno di intensa attività secretoria e una ipertrofia dei cordoni steroideogenici le cui cellule sono fortemente vacuolizzate. Anche negli anfibi gli alchilfenoli influenzano sintesi e rilascio delle catecolamine e, al contrario dei rettili, si nota una inibizione della sintesi dei corticosteroidi. La tiroide di *Podarcis* appare fortemente inibita dall'azione degli alchilfenoli e all'aumento del TRH non corrisponde un incremento del TSH e conseguentemente di T3 e T4. I follicoli tiroidei sono circondati da cellule epiteliali basse e la colloide mostra scarsi segni di riassorbimento. I dati ottenuti fanno ipotizzare una azione diretta sull'ipofisi.

I dati delle nostre ricerche dimostrano che la presenza nell'ambiente e l'uso indiscriminato degli EDCs influenzano negativamente la funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi-ghiandole adrenali/tiroide, ghiandole che rivestono un ruolo importante nel metabolismo dell'individuo. E' stato anche dimostrato che queste sostanze alterano i processi riproduttivi e pertanto il loro uso deve essere controllato per non avere ripercussioni negative sia sulla sopravvivenza delle specie che sulla salute umana.

APPROCCI TRADIZIONALI E MODERNI PER VALUTARE GLI EFFETTI DEGLI INTERFERENTI ENDOCRINI IN AMBIENTE ACQUATICO

M. Maisano, A. Mauceri, S. Fasulo

Dipartimento di Biologia Animale ed Ecologia Marina, Università degli Studi di Messina

L'ambiente acquatico è particolarmente esposto agli effetti dei contaminanti di tipo estrogenico, rilasciati in mare dalle attività urbane ed industriali, dove persistono per lunghi periodi e di conseguenza influenzano la normale attività endocrina e riproduttiva degli organismi. Negli ultimi anni è diventato un comune interesse internazionale identificare e caratterizzare l'attività endocrina dei molteplici contaminanti ambientali e quindi valutare l'impatto che possono avere sull'uomo, particolarmente esposto per la sua posizione nella rete trofica.

Per il biomonitoraggio degli ambienti acquatici vengono abitualmente utilizzati come bioindicatori sia molluschi bivalvi che specie ittiche.

In questa ricerca si è valutata l'azione degli interferenti endocrini attraverso la presenza ed i livelli di espressione della vitellogenina (Vtg), glicolipofosfoproteina precursore delle proteine del tuorlo, utilizzata come biomarker di effetto degli xenoestrogeni.

In particolare sono stati utilizzati come bioindicatori *Mytilus galloprovincialis* e *Chelon labrosus*, campionati in aree interessate da differente impatto antropico ed industriale. Sono state effettuate le analisi della Vtg mediante il metodo ALP (alkali-labile phosphate), per una indagine quantitativa della presenza di fosfati liberi, ed una indagine immunoistochimica e di espressione genica della Vtg.

I risultati ottenuti hanno evidenziato una accentuata immunopositività ed espressione della vitellogenina negli individui di sesso maschile provenienti dai siti contaminati. Negli organismi di sesso femminile provenienti dalle stesse aree è stato inoltre riscontrato un incremento della vitellogenina che potrebbe suggerire uno spawning anticipato causato dall'esposizione ad agenti estrogenici che influenzano la regolazione ormonale dello sviluppo dei gameti.

Ai tradizionali e consolidati biomarkers indagati si possono affiancare tecniche innovative ed alternative, che prevedono l'uso degli embrioni dei pesci per studi di tossicità (FET). I FET si rivelano utili per saggiare l'attività di noti e/o sospetti interferenti endocrini in condizioni controllate e riproducibili. Tali test, riconosciuti dall'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OECD), si sono dimostrati migliori per aspetto etico, economico ed applicativo rispetto ai classici test di tossicità acuta.

NEW BIOSENSORS FOR BPA DETECTION

D. Moscone^a, F. Arduini^a, M. Portaccio^b, D. Di Tuoro^b, D.G. Mita^b, M. Lepore^b

^a *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma Tor Vergata, Rome, Italy*

^b *Dipartimento di Medicina Sperimentale, Seconda Università di Napoli, Napoli, Italy*

Recently, Bisphenol A (BPA) has received considerable attention due to its endocrine disrupting activity and possible toxic impact on environment. It is an important organic chemical owing to its wide use as intermediate in the manufacture of polycarbonate plastics, epoxy resins, and flame retardants. Its main use is as coating of metallic cans, powder paints, dental fillings, and antioxidant in plastics. It is also been used as an inert ingredient in pesticides, antioxidants and polyvinyl chloride stabilizer, so BPA levels in the low $\mu\text{g/L}$ range have been found in clinical, food and water samples. The above findings suggest that it is necessary to determine the BPA presence also in trace amounts. Traditional methods for BPA detection include chromatographic techniques coupled with mass spectrometry, capillary electrophoresis and solid phase microextraction, methods that are time consuming, cannot be performed on-site and require sample pre-treatment. Electrochemical sensors can provide rapid and on-site BPA detection.

In this presentation the development of new biosensors for the determination of BPA will be illustrated, both using classical and disposable electrochemical sensors (SPE) and enzymes such as tyrosinase and laccase eventually combined with properly chosen redox-active compounds. In order to increase the analytical performance of the proposed biosensors, the screen printed sensors have also been modified by using nanostructured materials (carbon black).

Application of the new biosensors in real samples such as in peeled tomatoes stored in metallic cans, will be also presented.

Sessione
***“OMICS: Epigenomica – Proteomica -
Metabolomica”***

EPIGENETIC REGULATION OF CLUSTERIN EXPRESSION IN HUMAN PROSTATE CANCER CELLS

Saverio Bettuzzi

National Institute of Biostructure and Biosystems (INBB), Rome, Italy; Department of Biomedicine, Biotechnology and Translational Research and Centre for Molecular and Translational Oncology (COMT), University of Parma, Parma, Italy. E-mail: saverio.bettuzzi@unipr.it

Clusterin (CLU) is a highly conserved protein expressed in almost all human tissues and fluids. It is involved in many cellular processes, including apoptosis and cell survival. CLU gene was recently found epigenetically regulated. CLU is down-regulated in many tumours, including prostate cancer and neuroblastoma, where it acts as a tumour suppressor. Several CLU transcripts, with different sequences at the 5' end, are produced from the single copy human CLU gene. At the moment very little is known about their functions and regulation. We studied the expression of two CLU mRNAs in a collection of immortalized and cancer human cell lines and benign controls. We have also investigated how expression of CLU is affected by epigenetic drugs such as 5-Aza-2'-deoxycytidine (AZA) or trichostatin A (TSA).

Total RNA was extracted from normal embryonic lung fibroblasts (WI-38), immortalized cells (BEAS2B, HT125, PNT1a) and cancer epithelial cells (A549, MCF7, PC3, DU145) grown under standard condition, and relative expression of CLU mRNAs was evaluated by RT-PCR. CLU mRNAs have been quantified also in prostate cancer PC3 and DU145 cells treated with AZA, TSA or a combination of the two drugs. Methylation of the CLU promoter was assessed by Methylation specific PCR. Histone H3 tail modification by acetylation/methylation at the CLU promoter was assessed by Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assay and quantitative PCR (q-PCR).

One of the two CLU mRNAs studied is constitutively expressed across all cell lines tested, while the other is virtually absent in cancer cells and only detectable in normal or immortalized cells. The CLU promoter contains a CpG island that is methylated in prostate cancer cells, but not methylated in normal cells. The CLU mRNA silenced by cell transformation is re-expressed in prostate cancer cells by treatment with AZA and TSA. Re-expression of silenced CLU mRNA was associated to nuclear translocation of CLU and apoptotic cell death. TSA alone, or in combination with AZA, increases H3 post-translational modification (H3-Ace, H3Lys9Ace, H3Lys9Met3) in the CLU promoter. These changes are associated with active transcription of the gene.

In conclusion our data unravel the mechanisms by which CLU is down-regulated during cell transformation confirming its potent tumor-suppressor activity. We show that:

1. expression of one of the two CLU transcripts tested clearly negatively correlates with tumorigenesis;
2. this specific CLU mRNA transcript is epigenetically down-regulated in prostate cancer cells, mainly through chromatin remodelling;
3. treatment of prostate cancer cells with epigenetic drugs triggers re-expression of the silenced CLU mRNA and induces nuclear translocation of CLU and cell death.

PUSH THE LIMITS IN MASS SPECTROMETRY

Marco Biglietto

AB SCIEX Italy

The aim of the work is to highlight how it is important to push the limits in Mass Spectrometry not only for Sensitivity but also for Specificity and Selectivity. The increase of Sensitivity it is possible after the ASMS 2012 due to the introduction of a new concept of technology called “Ion Drive Technology”. The implementation of the Specificity is a consolidation of the QTRAP technology and its MRM₃ that is very appreciated in some quantitative experiments where the MRM does not have enough specificity for example due to the matrix effect. The Selectivity is one of the most important feature of a Mass Spectrometry and for this reason a lot of efforts are done from the R&D department in this direction and two years ago AB SCIEX produced a way to increase the Selectivity called Differential Mass Spectrometry or SelexIon.

EPIGENOMA, EDC ED ENDOCRINOLOGIA: UNA “TRIPLA E” PER UN DELICATO EQUILIBRIO

Lavinia Casati¹, R. Sendra², M. Esteller³, Berdasco M.³, O. Mornati¹, F. Celotti¹, P. Negri-Cesi¹

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Sezione di Biomedicina ed Endocrinologia, Unità di Ricerca INBB, Università degli Studi di Milano, Via Balzaretti 9, Milano

²Departament de Bioquímica i Biologia Molecular Universitat de València, C/Dr Moliner 50, 46100-Burjassot, València, Spain

³Cancer Epigenetic and Biology Program; Bellvitge Institute for Biomedical Research (IDIBELL) and Catalan Institute of Oncology (ICO) – Barcellona, Spagna

L'epigenoma è considerato un bersaglio d'eccellenza per le influenze ambientali; è inoltre opinione comune che parte della suscettibilità individuale nei confronti dello sviluppo di numerose patologie, tra cui alcuni disordini neurologici, sia il risultato del rimodellamento dell'epigenoma operato dall'ambiente stesso (Lee et al., 2012). L'epigenetica può essere considerata il trait d'union tra la genetica e l'ambiente, nesso che viene esplicito anche attraverso l'interazione con il sistema endocrino (Zhang et al., 2011). Dalla letteratura è noto infatti come numerosi enzimi, coinvolti in processi epigenetici chiave (fra cui gli enzimi che catalizzano le modificazioni post-traduzionali degli istoni), modulino e siano modulati dal sistema endocrino. Ad esempio, il recettore degli androgeni (AR) interagisce con demetilasi istoniche (come Jarid o LSD1) e la deacetilasi CBP agisce da cofattore per diversi recettori per ormoni steroidei (Xiang et al., 2007, Leader et al., 2006).

E' ormai associato che l'esposizione ad inquinanti ambientali, soprattutto a quelli con azione interferente endocrina (EDC), è in grado di modificare l'epigenoma. Innumerevoli studi in letteratura riportano questa sensibilità dell'epigenoma agli EDC; basti ricordare la modulazione del profilo di metilazione del DNA in seguito all'esposizione a vinclozolina (che si perpetua nelle generazioni), a genisteina, a bisfenolo A o a dietilstilbestrolo (Dolinoy et al., 2006 e 2007, Sato et al., 2006, Anway et al., 2005).

Studi condotti nel nostro laboratorio hanno evidenziato che l'esposizione in utero a bifenilipoliclorurati (PCB) è in grado sia di modulare in modo dimorfico diversi parametri neuroendocrini (Colciago et al., 2006 e 2009), sia di modificare il profilo epigenetico nel tessuto epatico, un organo non solo sede di accumulo e di metabolismo dei PCB, ma anche bersaglio della loro azione (Casati et al., 2012). In particolare, gli esperimenti più recenti hanno messo in luce come l'effetto dei PCB sull'epigenoma sia sesso specifico e, per alcuni parametri, alteri una situazione già dimorfica in partenza. Gli effetti più evidenti riguardano una riduzione della trimetilazione della lisina 4 dell'istone H3 (H3K4me3), e dell'acetilazione della lisina 16 dell'istone H4 (H4K16Ac). Poiché H4K16Ac è correlabile positivamente con (e consegue alla) presenza della modificazione H3K4me3 (Wang et al., 2009), è possibile che la riduzione significativa di H4K16Ac osservata nelle femmine trattate sia conseguente alla riduzione di H3K4me3. Nello stesso lavoro è emerso come i PCB siano in grado di indurre in maniera sesso specifica l'espressione di Jarid1b, la demetilasi correlata proprio con H3K4me3 (Casati et al., 2012).

Come già detto, AR può interagire con le demetilasi; abbiamo quindi analizzato il profilo di espressione genica e proteica di AR nel fegato degli animali esposti. I risultati hanno evidenziato anche per AR un'espressione dimorfica nei controlli (F>M), che nelle femmine esposte viene ridotta fino ad annullare il dimorfismo. Dato che: 1) l'analisi delle isole CpG presenti nella sequenza promotrice del gene di AR non ha evidenziato alcuna alterazione del pattern di metilazione; 2) esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina non hanno rivelato alterazioni differenziali per la presenza di H3K4me3 a livello del promotore di AR fra gli animali di controllo e quelli esposti, si può ipotizzare che la diminuita espressione di AR non sia una diretta conseguenza

dell'alterazione di H3K4me3 e che gli effetti dei PCB osservati siano dovuti all'alterazione degli enzimi coinvolti nelle modificazioni istoniche post-traduzionali.

Non solo AR è in grado di interagire con Jarid1b, ma quest'ultimo è in grado di potenziare l'attività trascrizionale di AR stesso (Xiang et al., 2007). Inoltre, dalla letteratura, è noto che alcuni PCB si comportano da androgeni/antiandrogeni (Hamers et al., 2011, Portugal et al., 2002) e che AR regola la sua stessa espressione genica mediante un meccanismo di feedback negativo (Vismara et al., 2009). Correlando queste informazioni, ci siamo proposti di indagare se e come i PCB influenzassero l'interrelazione tra AR e Jarid1b. In studi in vitro condotti sulle cellule HEK 293 trasfettate in transiente con AR e già utilizzate in innumerevoli studi per valutare l'attività di Jarid1b (Roesch et al., 2008, Xiang et al. 2007), abbiamo valutato l'attività trascrizionale indotta dai PCB. Dai risultati ottenuti è emerso innanzitutto come la miscela di PCB è in grado di modulare l'attività trascrizionale di AR (analizzata mediante saggi di attività luciferasica) agendo da agonista o da antagonista a seconda della presenza o meno del ligando naturale; inoltre, la co-trasfezione di Jarid1b è in grado di potenziare l'attività trascrizionale di AR indotta sia dai PCB sia dal DHT (Casati et al., 2012). Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti anche in due differenti linee cellulari di origine neuronale (NSC34 e le GN11), suggerendo che la demetilasi svolga un ruolo indipendente dalla tipologia del ligando e dal fenotipo cellulare. Analizzando la localizzazione cellulare di AR in presenza dei PCB, è emerso poi come la traslocazione nucleare del recettore attivato sia potenziata dalla presenza di Jarid1b, a conferma degli esperimenti precedenti. Poiché, come detto, AR controlla la sua espressione genica mediante feedback negativo e i PCB sembrano favorire questo meccanismo, per comprendere meglio l'interrelazione AR-Jarid1b-PCB, abbiamo innanzitutto condotto un'analisi in silico del promotore di AR, mediante la piattaforma Genomatix, che ha rivelato la presenza di una serie di siti di legame putativi per Jarid1b nelle regioni sia distale che prossimale del promotore. Abbiamo quindi usato una serie di plasmidi codificanti per sequenze a differente lunghezza del promotore di AR fusi con il gene reporter della luciferasi (messi a disposizione dal Prof. A. Poletti, Vismara et al. 2009). Da questi studi è emerso che: 1) i PCB auto-downregolano l'espressione genica di AR; 2) Jarid1b potenzia l'azione dei PCB in modo dipendente dalla lunghezza del promotore di AR. Infatti, la capacità dei PCB di auto-downregolare AR è massima solo in presenza di tutto il promotore e si perde con sequenze intermedie o brevi. La presenza dell'enzima Jarid1b potenzia l'auto-downregolazione di AR attivata dai PCB, inducendola in modo proporzionale al numero di siti di riconoscimento per Jarid1b presenti nei vari plasmidi utilizzati.

Numerose evidenze suggeriscono che il rimodellamento epigenetico indotto da stimoli ambientali possa avere un ruolo in disordini neurologici; inoltre, alcuni studi correlano le "varianti corte" del tratto poliglutamminico di AR ad una maggiore suscettibilità a sviluppare patologie come l'autismo (Henningsson et al., 2009). Abbiamo pertanto investigato se la modulazione dei PCB dell'interazione AR-Jarid1b potesse dipendere dalla lunghezza del tratto poliglutamminico N-terminale di AR. Abbiamo utilizzato, quindi, plasmidi contenenti AR con tratti poliQ differenti (AR-polyQ12 e AR-polyQ48) ed esaminato l'attività trascrizionale su geni bersaglio. Dai risultati è emerso che, mentre i PCB sembrano in grado di transattivare entrambe le varianti, l'effetto potenziante di Jarid1b sembra essere presente solo con la variante polyQ corta.

In conclusione è possibile supporre che la modulazione dell'espressione e/o dell'attività trascrizionale di AR da parte dei PCB possa coinvolgere il rimodellamento cromatinico e, in special modo, l'interrelazione tra AR e Jarid1b. Questi risultati, ottenuti anche in linee cellulari neuronali, aprono un'interessante prospettiva sul possibile ruolo di AR-Jarid1b-PCB in alcune patologie neurologiche, come l'autismo, ad eziologia in gran parte sconosciuta. L'ipotesi di un dialogo che regoli il delicato equilibrio tra epigenoma, influenze ambientali e funzionalità endocrina, schiude panorami affascinanti.

Bibliografia essenziale

Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. *Science* 308, 1466–1469 (2005).

Casati L, Sendra R, Colciago A, Negri Cesi P, Berdasco M, Esteller M, Celotti F. *Epigenomics* 4(1), 101–112 (2012).

Colciago A, Negri-Cesi P, Pravettoni A, Mornati O, Casati L, Celotti F. *Reproduct. Toxicol.* 22, 738–745 (2006).
Colciago A, Casati L, Mornati O *et al* *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 239, 46–54 (2009).
Dolinoy D, Huang D, Jirtle RL. *Proc. Natl Acad. Sci.* 104, 13056–13061 (2007).
Dolinoy DC, Weidman JR, Waterland RA, Jirtle RL. *Environ. Health Perspect.* 4, 570–576 (2006).
Hamers T, Kamstra JK, Ceniñ PH *et al.* *Toxicol. Sci.* 121(1), 88–101 (2011).
Henningsson S, Jonsson L, Ljunggren E. *et al.*, *Psychoneuroendocrinology.* 34(5):752-61 (2009).
Leader JE, Wang C, Fu M, Pestell RG. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1589–1596 (2006).
Lee & Alisch *Epigenomics* 4(4), 355–357 (2012).
Portigal CL, Cowell SP, Fedoruk *et al.* *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 15,185–194 (2002).
Roesch A, Mueller AM, Stempf T, Moehle C, Landthaler M, Vogt T. *Int Jour Cancer* 122: 1047–105 (2008)
Sato K, Fukata H, Kogo Y, Ohgane J, ShiotaK, Mori C. *Endocr. J.* 53, 331–337 (2006).
Vismara G, Simonini F, Onesto E *et al.* *Neurobiol. Dis.* 33, 395–404 (2009).
Wang Z, Zang C, Cui K *et al.* *Cell* 138, 1019–1031 (2009).
Xiang Y, Zhu Z, Han G *et al* *Proc. Natl Acad. Sci.* 104, 19226–19231 (2007).
Zhang X and Ho SM. *Journal of Molecular Endocrinology* 46, R11–R32 (2011).

UVI5008: UN TRIPLO INIBITORE EPIGENETICO CON ATTIVITÀ ANTI-CANCRO

Angela Nebbioso & Lucia Altucci

*Dipartimento di Patologia Generale, Seconda Università degli Studi di Napoli, Vico L. De
Crecchio 7, 80138 Napoli.*

L'epigenetica è lo studio delle modificazioni chimiche che regolano l'espressione dei geni senza alterare la loro sequenza di DNA. Cambiamenti nell'azione degli enzimi epigenetici sembrano avere un ruolo nel determinare molti tipi di cancro, attraverso l'espressione inappropriata di certi geni. Il ripristino del corretto equilibrio tra le attività di tali enzimi si è rivelato un'efficace terapia anti-cancro e ha portato allo sviluppo di una serie di famiglie di medicinali ad azione epigenetica, chiamate epi-drugs, il cui meccanismo d'azione resta ancora non completamente chiarito.

Qui, descriviamo il meccanismo d'azione di UVI5008, un nuovo modificatore epigenetico, che inibisce contemporaneamente tre distinte classi di enzimi: le istone deacetilasi, le sirtuine e le DNA metiltransferasi. UVI5008, derivato di un prodotto naturale, risulta altamente efficiente ad indurre morte tumore-selettiva in una varietà di linee cellulari tumorali (sia ematologici che solidi) nonché in modelli murini xenograft di tumore del colon umano ed in modelli murini genetici di carcinoma mammario umano .

La sua attività anti-tumorale comporta l'attivazione dei recettori di morte e la produzione delle specie reattive dell'ossigeno. Da sottolineare è che l'azione di UVI5008 non è dipendente da fattori come p53, BMF e/o TRAIL, poiché esso è capace di indurre efficientemente la morte anche in linee cellulari mutate o deficienti per questi fattori. Ciò limita il rischio di sviluppo della resistenza al farmaco, massimizzando il suo spettro di applicazione. La modulazione simultanea di più enzimi epigenetici offre una promettente alternativa ai trattamenti combinati usati nella terapia tumorale mettendo in luce l'altissimo potenziale che una monoterapia a più bersagli può offrire.

Nebbioso A, Pereira R, Khanwalkar H, Matarese F, García-Rodríguez J, Miceli M, Logie C, Kedinger V, Ferrara F, Stunnenberg HG, de Lera AR, Gronemeyer H, Altucci L. Death receptor pathway activation and increase of ROS production by the triple epigenetic inhibitor UVI5008. Mol Cancer Ther. 2011 Dec;10(12):2394-404.

L'USO DELLA METABOLOMICA NELLO STUDIO DEGLI ERRORI CONGENITI DEL METABOLISMO

Margherita Ruoppolo, DBBM, CEINGE Napoli

Marianna Caterino, DBBM, CEINGE Napoli

Emanuela Scolamiero, CEINGE Napoli

Le malattie congenite del metabolismo costituiscono un numero elevato di patologie ereditarie caratterizzate da difetti genetici che interferiscono sul normale funzionamento dei meccanismi metabolici e biochimici nell' uomo.

Quando si sospetta una malattia metabolica ereditaria è fondamentale formulare in tempi rapidi una diagnosi ed iniziare con un trattamento specifico: infatti, anche se non completamente guaribili, tali disordini sono in alcuni casi curabili con farmaci e diete, purchè la diagnosi venga fatta precocemente, nei primi giorni di vita.

La metabolomica offre oggi pannelli di analisi e protocolli per lo studio delle malattie emtaboliche ereditarie. La GC/MS e la LC-ESI-MS/MS (spettrometria di massa tandem) sono oggi due fra le più utilizzate tecniche per identificare malattie congenite del metabolismo ed affettuare il monitoraggio di pazienti in trattamento.

Lo screening neonatale allargato di malattie congenite del metabolismo è un test che viene effettuato nei nuovi nati entro le prime 72 ore di vita e che consente di identificare contemporaneamente circa 40 patologie dovute a difetti nel metabolismo degli acidi organici, della beta-ossidazione degli acidi grassi, degli aminoacidi e del ciclo dell'urea. Lo screening neonatale consiste nel prelievo di alcune gocce di sangue del neonato che vengono fatte adsorbire su speciali cartoncini assorbenti. Su queste gocce, attraverso l'utilizzo della spettrometria di massa tandem, vengono esaminati gli analiti le cui alterazioni sono direttamente riferibili ad una malattia metabolica e le cui sintomatologie possono esordire fin da subito o anche dopo alcuni mesi o anni dalla nascita.

Nel corso della relazione verranno illustrati i vantaggi e le criticità dei programmi di screening metabolici allargati. Si commenteranno le esperienze internazionali (Germania, USA, Australia, Paesi Arabi) e l'esperienza italiana basata principalmente su 5 centri (Firenze, Genova, Napoli, Padova e Roma). In particolare verranno discussi i primi risultati ottenuti dal progetto pilota di screening allargato di malattie congenite del metabolismo condotto nella regione Campania dal CEINGE in collaborazione con il Centro di Riferimento Regionale Clinico sulle Malattie Metaboliche Rare e 13 centri nascita della provincia di Salerno. Nel corso di tale progetto sono stati identificati le seguenti malattie metaboliche ereditarie: 2 casi di difetto di acil-CoA deidrogenasi a media catena, 1 caso di deficit di β -chetotiolasi (2), 1 caso di deficit di acil-CoA deidrogenasi a catena corta/ramificata, 1 caso di acidemia propionica, 1 caso di CblC acidemia metilmalonica, 1 caso di acidemia isovalerica, 1 caso di deficit di isobutirril-CoA deidrogenasi. Inoltre è stato identificato 1 caso di acidemia metilmalonica da deficit di vitamina B12 materna.

Session
“Nutraceutica”

REGOLAZIONE DEI SEGNALI CELLULARI DA MOLECOLE NUTRIZIONALI: IL MECCANISMO DI AZIONE DEI FLAVONOIDI

Maria Marino

Dipartimento di Biologia, Università Roma Tre, Viale G. Marconi, 446, I-00146 Roma, Italy.

Diverse ricerche sperimentali ed epidemiologiche sostengono il potenziale effetto benefico di alcuni componenti della dieta, tra cui i flavonoidi, sulla salute umana. Come esempio, l'adozione di diete ricche di frutta e verdura, insieme al mantenimento dell'attività fisica e di un'appropriata massa corporea, possono ridurre nell'uomo l'incidenza del cancro del 30-40%. I flavonoidi, metaboliti secondari di molte piante vascolari utilizzate nella dieta umana, sono stati acclamati per i loro effetti sulla riduzione dell'incidenza di patologie vascolari, osteoporosi, patologie neurodegenerative e sulla riduzione dell'infiammazione sia cronica che acuta. Eppure i flavonoidi possiedono una lunga storia nella scienza. La loro attività biologica, infatti, fu riportata negli anni 40 dello scorso secolo come il principio anti-estrogenico che causava l'infertilità negli allevamenti di ovini nell'Ovest dell'Australia. Questi effetti fecero inserire i flavonoidi nella nascente classe degli interferenti endocrini: sostanze in grado di alterare la sintesi, il trasporto e l'azione degli ormoni, principalmente di quelli steroidei. Nonostante queste evidenti contraddizioni, i flavonoidi sono comunemente venduti come prodotti da banco in tutte le farmacie e parafarmacie, recentemente il loro consumo è stato aumentato dal loro uso, consigliato dai ginecologi, come terapia sostitutiva per prevenire i sintomi del climaterio. Il successo commerciale dei flavonoidi è evidente, anche se i loro meccanismi d'azione e i loro eventuali effetti collaterali sono ancora sconosciuti.

Come molti altri componenti della dieta, i flavonoidi agiscono attraverso meccanismi multipli che rendono estremamente complessa la diretta associazione tra il consumo di specifici alimenti e la riduzione del rischio di insorgenza di patologie degenerative. Data la loro struttura chimica polifenolica, il più ovvio meccanismo dei flavonoidi è quello di funzionare da accettori di specie radicaliche riducendo, così, il potenziale dannoso di queste molecole. Eppure, la recente letteratura suggerisce che l'uso di sostanze con una composizione chimica compatibile con una putativa capacità antiossidante può attivare meccanismi indipendenti da questa capacità. Sono stati riportati interazioni dirette tra i flavonoidi e specifici componenti cellulari che possono alterare, ad esempio, l'attività enzimatica o modulare l'attività dei recettori per gli ormoni steroidei sessuali attraverso meccanismi competitivi o allosterici. Quest'ultimo meccanismo risulta particolarmente interessante alla luce degli effetti di interferenza o mimetici dei flavonoidi riportati in precedenza.

Il nostro gruppo di ricerca si occupa da anni di individuare i meccanismi di azione dei flavonoidi dipendenti o indipendenti dal legame con i recettori degli ormoni steroidei sessuali nell'ottica di definire gli effetti positivi e/o quelli negativi di queste sostanze. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza la capacità di due differenti flavonoidi (naringenina e quercetina) di legare i recettori per gli estrogeni α e β modificandone selettivamente il meccanismo di azione. In particolare, è stato messo in evidenza come, in presenza dei flavonoidi nutrizionali, i recettori modificano la loro associazione a proteine di segnale modificando, in questo modo, il bilancio tra proliferazione/apoptosi, proliferazione/differenziamento e sintesi/degradazione dei recettori. In conclusione, la regolazione dei segnali cellulari operata dai flavonoidi può condurre le cellule bersaglio verso un differente destino cellulare che si rivelerà positivo o negativo per la salute umana in dipendenza dallo stato funzionale dell'organismo (età, sesso, patologie).

ATTIVITÀ CHEMIO PREVENTIVA DELLE CATECHINE DEL TÈ VERDE NEL CANCRO DELLA PROSTATA

Federica Rizzi, Valeria Naponelli e Saverio Bettuzzi

Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali e Centro di Oncologia Molecolare e Traslazionale (COMT), Università di Parma, Parma; Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi (INBB), Roma.

Il tumore della prostata (CaP) rappresenta in Italia la neoplasia più frequentemente diagnosticata nel maschio adulto ed è la seconda causa di morte dopo il tumore del polmone. L'incidenza del CaP, raddoppiata nell'ultimo decennio, è da mettere in relazione con due fattori rilevanti: l'invecchiamento progressivo della popolazione e l'aumento della pressione diagnostica (PSA test). Considerando la prognosi infausta del CaP giunto in fase metastatica, è molto importante trovare strategie di prevenzione attuabili quando la malattia si presenta ancora in uno stadio potenzialmente curabile. La chemioprevenzione è, per definizione, una strategia di intervento farmacologico basata su composti sintetici o naturali che è in grado di prevenire, inibire o ritardare il processo di carcinogenesi.

Il cancro della prostata rappresenta un candidato ideale per la chemioprevenzione, a causa della sua elevata incidenza e del lungo periodo di latenza prima dello sviluppo della patologia clinicamente manifesta. Alcuni studi epidemiologici hanno evidenziato una correlazione diretta fra l'elevato consumo di tè verde delle popolazioni orientali e la bassa incidenza di alcuni tipi di tumori, incluso quello della prostata.

Uno dei componenti ritenuti maggiormente attivi dell'estratto di tè verde, l'EGCG, è capace di ridurre la capacità proliferativa di numerose linee cellulari tumorali e di promuovere, in queste stesse cellule, la morte per apoptosi.

I nostri risultati mostrano che l'EGCG è in grado di inibire la proliferazione e indurre morte cellulare nelle PNT1a (cellule prostatiche epiteliali immortalizzate con SV-40, che mimano le prime fasi della trasformazione neoplastica) a concentrazioni decisamente più basse di quelle richieste per ottenere gli stessi effetti nelle PC3 (cellule trasformate, scarsamente differenziate, androgeno indipendenti e tumorigeniche); mentre non altera la proliferazione di cellule di prostata normali in coltura primaria. Questo risultato è particolarmente interessante perché dimostra come l'effetto citostatico/citotossico dei polifenoli del tè verde sia specifico per le cellule trasformate, risultando inefficace in cellule ben differenziate di natura benigna.

I topi TRAMP (Transgenic Adenocarcinoma of Mouse Prostate) sono un modello transgenico di adenocarcinoma prostatico murino. In questi animali siamo riusciti ad inibire lo sviluppo del tumore in modo altamente significativo (80 % dei casi) somministrando loro, come unica bevanda dopo lo svezzamento, una soluzione acquosa allo 0,3% di un estratto standardizzato di tè verde.

Scopo delle nostre ricerche è anche stato quello di identificare quei geni la cui espressione risulta specificatamente modificata dalla somministrazione di GTE, nella speranza che potessero essere impiegati come biomarcatori nel monitoraggio clinico dell'efficacia del trattamento in pazienti trattati con GTE.

Uno dei geni più interessanti che abbiamo individuato è la clusterina (CLU), anche conosciuta come Apolipoproteina J (ApoJ), un gene implicato in numerose funzioni biologiche connesse con la morte e la proliferazione della cellula, la cui espressione viene down-regolata nel tumore della prostata (www.oncomine.org).

In collaborazione con l'Università di Modena e con l'Azienda Ospedaliera di Carpi (MO), abbiamo allestito uno studio clinico spontaneo della durata di un anno che ha fornito la prova ("proof-of-concept") dell'efficacia del GTE nella prevenzione del tumore alla prostata in pazienti con diagnosi di Neoplasia Intraepiteliale Prostatica di Alto Grado (HGPIA).

Sono stati arruolati, un totale di 60 volontari, randomizzati in doppio cieco in due gruppi: 30 sono stati trattati con 600 mg di GTE suddiviso in tre somministrazioni giornaliere in forma di capsule, mentre i restanti 30 ricevevano, secondo lo stesso schema di somministrazione, capsule di placebo.

Al termine dello studio, abbiamo rilevato un solo caso di cancro nei soggetti che avevano assunto GTE (corrispondente al 3% dei volontari trattati) mentre 9 dei 30 volontari appartenenti al gruppo placebo, equivalenti al 30% del totale, hanno sviluppato un cancro prostatico.

Uno studio di follow-up di circa due anni cui hanno partecipato 21 dei 60 volontari arruolati che nello studio di un anno ha evidenziato come gli effetti di chemioprevenzione del GTE siano durevoli anche dopo la sospensione del trattamento.

Concludendo, la prevenzione al posto della terapia sembra essere la parola chiave per ridurre l'incidenza del tumore prostatico ed i costi sanitari associati alla sua cura. I dati sperimentali ottenuti dal nostro laboratorio dimostrano che è possibile attuare un'efficace prevenzione per il cancro della prostata, servendosi di sostanze naturali, le catechine del tè verde, il cui profilo rischi-benefici risulta più favorevole di qualsiasi sostanza testata fino ad ora. Le ricerche effettuate dal nostro laboratorio hanno comunque evidenziato come sia necessario impiegare estratti standardizzati ad elevata concentrazione di catechine e a basso contenuto di caffeina piuttosto che semplici infusioni di tè verde, per ottenere risultati più riproducibili ed evitare effetti collaterali.

NUTRACEUTICI: DA COADIUVANTI A FARMACI.

L'importanza degli studi preclinici per la valutazione della tossicità e attività: caso-studio della Berberina

Aldo Roda^a, C. Colliva^a, S. Spinozzi^a, C. Camborata^a, C. Ianni^b, M. Roberti^b

^aDipartimento di Chimica "G. Ciamician", Università di Bologna, Via F. Selmi 2, 40126, Bologna, Italia

^bDipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Bologna, Via Belmeloro 6, 40126, Bologna, Italia

La tendenza di questi ultimi anni nel settore della nutraceutica è quella di isolare dal *pool* di sostanze contenute negli estratti naturali, singoli *lead* di composti e di somministrarli a dosi giornaliere caratteristiche dei farmaci (0,5-2 grammi) che spesso non rispecchiano più la quantità naturalmente presente nell'estratto di partenza.

Le autorità responsabili della sicurezza e della autorizzazione al commercio dei farmaci quali EMEA ed FDA non richiedono ancora studi preclinici né requisiti di purezza delle materie prime utilizzate prima della messa in commercio di queste sostanze. Tuttavia, pur trattandosi di derivati di estratti naturali, la somministrazione a dosi così elevate li rende a tutti gli effetti dei farmaci. Occorre quindi valutare attentamente gli eventuali rischi riguardanti la stabilità della materia prima, l'appropriata formulazione e l'individuazione della dose "potenzialmente efficace", abbandonando così a tutti gli effetti il campo della nutraceutica per addentrarsi nel campo della farmaceutica.

Sono stati recentemente documentati diversi effetti avversi dovuti non solo all'abuso, ma anche all'utilizzo di sostanze naturali a dosi "consigliate", in seguito ad un approccio superficiale legato al concetto che "una sostanza naturale non è tossica". Siamo quindi in presenza di un vuoto legislativo grazie al quale è possibile mettere in commercio in poco tempo, con una documentazione semplificata inviata al Ministero della Salute, un prodotto di dubbia origine: sostanze in cui il grado di purezza è documentato da una certificazione approssimativa, ottenuta senza l'utilizzo di metodi analitici validati e privi di studi di tossicità effettuati su modelli cellulari o animali. Tutto questo rappresenta un notevole fattore di rischio per la salute pertanto è necessario condurre studi di farmacocinetica e metabolismo per valutare l'eventuale tossicità diretta o mediata dai metaboliti ma anche per verificare l'attività farmacologica degli stessi.

Un esempio di questo approccio è rappresentato da questo studio condotto sulla berberina (BBR). La berberina è un alcaloide tetraidroisochinolinico appartenente alla categoria dei nutraceutici che possiede molteplici attività terapeutiche, tra cui l'effetto ipolipidemizzante. Al fine di comprendere la sua biodistribuzione in seguito a somministrazione orale, è stato studiato il metabolismo primario, dapprima identificando e quantificando i principali metaboliti primari (Berberrubina M1, Demetilenberberina M3 e Jatrorrhizina M4) nel plasma mediante HPLC-ES-MS/MS e successivamente, determinando per ciascuno di essi le principali proprietà chimico-fisiche, tra cui pKa, solubilità, lipofilia e affinità di binding con l'albumina sierica, proprietà che ne influenzano la biodisponibilità. Dalla correlazione di tali proprietà con i livelli plasmatici derivati da studi di farmacocinetica (C_{max} a seguito di somministrazione acuta di 500 mg di berberina a 12 soggetti sani: BBR 0.11 ± 0.04 nM, M1 1.38 ± 0.32 nM, M3 0.14 ± 0.02 nM, M4 0.13 ± 0.02 nM) e di biodistribuzione ($C_{steady-state}$: somministrazione cronica di 15 mg/kg giorno di berberina a 12 pazienti affetti da iperlipidemia BBR 4.0 ± 2.0 nM, M1 6.5 ± 1.9 nM, M3 1.75 ± 1.0 nM, M4 5.6 ± 2.0 nM) è emerso che la berberina presenta un insolito metabolismo, responsabile della produzione di metaboliti talvolta più lipofili del principio attivo stesso (con valori di $\text{Log}P_{o/w}$ rispettivamente di: BBR -1.19, M1 1.67, M3 -1.27, M4 -1.29) suggerendo che queste molecole potrebbero essere potenzialmente attive come o anche più del principio attivo stesso. In particolare, gli alti livelli plasmatici suggeriscono che M1, rispetto agli altri metaboliti e alla BBR, potrebbe essere soggetto ad un efficace assorbimento intestinale per diffusione passiva, in virtù della maggiore lipofilia dovuta probabilmente ad un tautomerismo chetoenolico dovuto alla vicinanza del gruppo ossidrilico

all'atomo di azoto quaternario. Sulla base di queste considerazioni sembrerebbe che M1 sia il candidato migliore per la progettazione di nuovi profarmaci, per il quale potrebbero essere studiate opportune formulazioni per implementarne la biodisponibilità.

Questi risultati ci suggeriscono che è necessario cambiare l'approccio con il quale vengono studiate le sostanze naturali se si intende somministrarle a dosi caratteristiche dei farmaci, partendo da un'opportuna caratterizzazione chimico-fisica e analitica del principio attivo, per poi passare a studi preclinici dose-risposta di farmacocinetica, metabolismo e tossicità in modelli animali, seguita dall'ottimizzazione della formulazione ottimizzando gli eccipienti. Solo in seguito dovrebbero essere svolti studi clinici nell'uomo, finalizzati alla valutazione della "attività terapeutica" come dichiarato dal produttore.

**ABSTRACTS PRESENTATI DA
RICERCATORI NON STRUTTURATI**

BISFENOLO A ED OBESITÀ (II): EFFETTO DELL'ESPOSIZIONE IN VITRO DI ADIPOCITI UMANI DIFFERENZIATI

Barba V. (1), Menale C. (1), Crispi S. (2), Piccolo M.T. (3), Cirillo G. (4), Mita D.G. (1,2,3), Nicolucci C. (1,3), Miraglia Del Giudice E. (4), Perrone L. (4), Diano N. (1,2,3)

(1) Seconda Università di Napoli, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Via Costantinopoli, 16 - 80138 Napoli

(2) Istituto di Genetica e Biofisica A. Buzzati Traverso CNR, via P. Castellino 111 Napoli

(3) Consorzio Interuniversitario Istituto Nazionale di Biostrutture e biosistemi (INBB), Viale Medaglie d'Oro 305 Roma

(4) II Università di Napoli, Dipartimento di Pediatria 'F. Fede', Via Luigi De Crecchio, 4 - 80138 Napoli

Parole chiave: BPA, obesità, adipociti

Il Bisfenolo A (BPA) è un monomero utilizzato nella produzione di plastiche di policarbonato e di resine epossidiche per il rivestimento di contenitori metallici per alimenti. Il BPA è uno degli inquinanti che maggiormente alterano il normale funzionamento del sistema endocrino degli organismi esposti, interagendo con diversi recettori di membrana e nucleari, in particolare quelli per gli estrogeni. La maggiore esposizione al BPA, definito per questo Interferente Endocrino (IE), avviene attraverso la catena alimentare. L'esposizione al BPA ha un effetto negativo sullo sviluppo di diverse patologie tra cui l'obesità in cui è stata ipotizzata l'alterazione di diverse vie endocrino-metaboliche legate ad una variazione nell'espressione genica conseguente alle interazioni di vari ligandi con i recettori per gli estrogeni. Sembra quindi possibile una correlazione tra l'attività xenoestrogenica del BPA e l'obesità. Per investigare questa correlazione, abbiamo studiato in vitro gli effetti dell'esposizione al BPA sull'espressione genica di adipociti umani. Dopo l'ottimizzazione della messa in coltura di preadipociti da tessuto adiposo umano, il loro differenziamento in adipociti maturi e l'estrazione dell'RNA totale da tali cellule, abbiamo valutato i livelli di espressione genica di alcune proteine in seguito a stimolo xenoestrogenico. Sono stati oggetto di studio porzioni di tessuto adiposo sottocutaneo provenienti da bambini maschi in età prepubere e normopeso. Adipociti maturi differenziati sono stati trattati con BPA a diverse concentrazioni ambientali (1 nM, 10 nM, 100 nM) per valutare quella che maggiormente esplica attività estrogenica interferendo con l'espressione genica. Come controlli sono stati utilizzati adipociti non trattati e adipociti stimolati con il 17 β -estradiolo (E2, 1 nM). L'estrogenicità del BPA è stata valutata mediante Real Time RT-PCR quantitativa analizzando l'espressione di geni target come a) il gene codificante il recettore per gli estrogeni α (ER α); b) l'adiponectina, una proteina i cui livelli circolanti nei soggetti obesi sono inversamente correlati alla percentuale di grasso corporeo, all'Indice di Massa Corporea, ai livelli plasmatici di insulina e alla tolleranza al glucosio; c) la leptina, un ormone prodotto nel tessuto adiposo e presente in concentrazioni ematiche proporzionali alla quantità di trigliceridi contenuta negli adipociti e d) la resistina, una citochina secreta probabilmente in proporzione al grado di adiposità, che inibisce l'azione dell'insulina, una delle cause dei legami tra l'obesità e il diabete tipo 2. Il gene codificante ER α è risultato upregolato, suggerendo che il BPA, interagendo con esso, ne induce l'iperespressione alterando i processi di signaling a carico dei recettori per gli estrogeni stessi. In particolare, somministrando diverse dosi di BPA, si evidenzia una dipendenza dell'alterazione dell'espressione genica dalla dose somministrata. Da queste indagini è emerso che la concentrazione di BPA con maggiore effetto xenoestrogenico è 10 nM, dato confermato anche dall'iperespressione ottenuta somministrando E2 alle colture. È stata rilevata una down-regolazione BPA dose-dipendente per quanto riguarda l'espressione del gene codificante l'adiponectina, mentre la leptina è iperespressa in seguito a stimolo xeno estrogenico. La resistina risulta non espressa nelle cellule adipose non trattate, come confermano dati di letteratura, ma si nota una lieve espressione

solo dopo esposizione a BPA supportando ancor di più l'ipotesi che l'esposizione a dosi ambientali di BPA (10 nM) possa in qualche modo contribuire all'insorgenza delle diverse complicanze metaboliche dell'obesità. Sono in corso esperimenti di valutazione dell'espressione genica differenziale mediante tecnologia microarray per approfondire lo studio dei pathways biochimici di cellule adipose alterati dall'azione estrogeno-simile del Bisfenolo A.

A PYTHON IMPLEMENTATION OF THE HYPOTHETICAL ACTIVE SITE LATTICE

Basile L.^{1*}, Floris M.², Medda R.², Guccione S.^{1,3}, and Doweyko A.⁴

¹ETNALEAD s.r.l., c/o Etna Building -Scuola Superiore di Catania- via S. Nullo 5i, I-95123 Catania (Italy).

²CRS4, Biomedicine, c/o Parco Polaris, Pula (CA, Italy)

³Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Catania, V.le A. Doria 6, I-95125, Catania, Italy.

⁴Consultant and Adjunct Professor, Indian River State College, Vero Beach, FL 32963, USA.

Email: liviabasile82@gmail.com

Drug designers occupy centre stage in the bio-pharmaceutical research enterprise. Their role is to repeatedly pose, and then answer, one of the most important question facing a drug discovery program: “*what compound(s) should we make next?*”.

Quantitative structure-activity relationships (QSAR) have been applied for decades in the development of relationships between physicochemical properties of chemical substances and their biological activities to obtain a reliable statistical model for prediction of the activities of new chemical entities. The fundamental principle underlying the formalism is that the difference in structural properties is responsible for the variations in biological activities of the compounds. 3D-QSAR has emerged as a natural extension to the classical Hansch and Free-Wilson approaches, which exploits the three-dimensional properties of the ligands to predict their biological activities using robust chemometric techniques such as PLS. QSAR certainly decreases the number of compounds to be synthesized by facilitating the selection of the most promising candidates.

The HASL methodology, introduced in late 80 's by Doweyko [1], has been successfully applied to several QSAR case studies with a performance comparable to that of the widely used 3D-QSAR CoMFA method [2]. The strategy is based on the discretisation of a superposed set of molecules to a set of lattice points defined by their 3D coordinates and atomic properties. The resulting lattice is then related to molecular properties, such as binding activity.

In this poster we address the challenges of developing an user-friendly toolkit, hopefully to maximize its exploitation by the design community.

A Python implementation of the Hypothetical Active Site Lattice (pyHASL) algorithm is presented here, with a set of novel features such as the possibility to load user-defined atomic properties. Furthermore, a Pymol [3] based interface allows a visual rendering of the results.

The methodology offers potential and new features:

- The ability to upload any type of atomic properties using a standard file format (eg. XML);
- Manage in an efficient way PyMol interface;
- An advanced feature allowing molecular “decoring” by *ad hoc* selected fragments.

[1] The Hypothetical Active Site Lattice. An Approach to Modelling Active Sites from Data on Inhibitor Molecules. A.M. Doweyko, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1396-1406

[2] 3D-QSAR Using “Multiconformer” Alignment: The Use of HASL in the Analysis of 5-HT_{1A} Thienopyrimidinone Ligands. S. Guccione, A. Doweyko, H. M. Chen, G. Uccello Barretta, F. Balzano, *J. Comput-Aided Mol. Des.* **2000**, *14*, 647-657.

[3] <http://sourceforge.net/projects/pymol/>

SERIAL GENE EXPRESSION ANALYSIS IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF PATIENTS WITH IDIOPATHIC AND HERITABLE PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION

S. Cantoni^{1,2}, M. Galletti^{1,2}, R. Tassinari^{1,2}, A. Guffanti³, E. Brini³, F. Zambelli¹, C. Ventura^{1,2}, N. Galie²

¹ National Institute Biostructures and Biomolecules, Bologna Italy; ² Cardiovascular Department University of Bologna, Bologna Italy; ³ Genomnia s.r.l.- Milano, Italy.

Introduction

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a rare disorder characterized by progressive increase in pulmonary vascular resistance, right ventricular failure and premature death. PAH can be idiopathic (IPAH), heritable (HPAH), or associated with other conditions, such as scleroderma or congenital heart disease.

Studying pulmonary vascular diseases, such as PAH, access to affected tissue is especially problematic for investigators. Due to high risk for complication, lung biopsies are not routinely performed, prompting for alternative cell sources and molecular approaches. In this contest the prominent role of inflammation in the development of PAH lead to consider peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) as a valuable tool for investigating pathologic processes, representing a convenient source for the assessment of alteration in gene associated with immune-related diseases. So far, only a few transcriptional studies for PAH have been performed with PBMCs using microarray analysis. Compared to this technique, Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) has remarkable advantages. Since it does not require prior knowledge of the sequences to be analyzed, SAGE can be used to obtain complete transcriptional profiles of expressed genes, albeit unknown genes.

Methods

SAGE allows quantitative analysis of thousands transcripts, relying on the principle that a short oligonucleotide sequence (tag) can uniquely identify mRNA transcripts. Tag frequency in SAGE library reflects transcript abundance. For the study we enrolled 15 PAH patients (5 IPAH non-responder, 5 IPAH responder, 5 HPAH), 4 healthy BMPR2 mutation carriers and 6 healthy subjects (HS). Patients were diagnosed according to the 2009 ESC/ERS guidelines and blood samples were collected before PAH therapy initiation.

Results

Starting from 6 million of tags, corresponding to 15,000 transcripts, comparative analysis of different groups revealed that significant differential expression was only restricted to a hundred of down- or up-regulated genes. Interestingly, computational analysis revealed that genes can be clustered into functional networks, sharing a number of crucial features in cellular homeostasis and signaling (migration, proliferation, inflammation). Overlapping analysis revealed genes shared between IPAH responder/ non-responder patients, and between HPAH patients/ healthy mutated carriers.

Conclusions

SAGE can provide affordable analysis of genes amenable for molecular dissection of PAH using PBMCs as a sentinel, surrogate tissue.

KHCO₃ AND D-RIBOSE: *IN VITRO* SLOWDOWN OF CANCER CELL GROWTH

S.Croci^{1,2}, **L. Bruni**^{1,2,3}

1 Neuroscience Department, Biophysics and Medical Physic Unit, Parma University

2 INBB- Nation Institute of Biosystem and Biostructure - Rome

3 Valsè Pantellini Foundation, Oviedo, Asturia Spain

Cancer cells have a glycolysis enhancement even in the presence of available oxygen. The “aerobic glycolysis”, known as the Warburg effect, is considered a fundamental metabolic alteration during malignant transformation. The up-regulation of glycolysis in tumour cells is well known and it is the rationale of F¹⁸-FDG PET diagnostic technique. This propriety is strictly link to the increase of sugar transporters (GLUTs) in most tumours. Also SGLT family transporters, which include the sodium-glucose symporter, are deregulated in many tumours. The influx of Na⁺ into tumour cells leads to a change into ions equilibrium, with particular reference to K⁺ intracellular concentration.

We investigated the effect of K:D-Rib on cell proliferation. Experiments performed on HTB-126 cells (human breast adenocarcinoma) demonstrate that the synergic action of KHCO₃ and D-ribose (K:D-Rib) has a cytostatic effect, reducing by 30% the doubling population time of treated cancer cells respect to the control.

HTB-126 cells were sown to perform the clonogenic assay. The water solution tested were K:D-Rib and K:D-Fruitt (KHCO₃ and D-fructose) at the concentration of 5mM. The clonogenic assay shows that the colonies formed during the incubation with 5 mM K:D-Rib (10 colonies) are significantly less respect to the control (23 colonies) but not if D-fructose (12 colonies) is used instead D-ribose. The colony shape of cells treated with K:D-Rib and K:D-Fruitt appears confined and with the inner part more compact respect to the control.

These experimental evidences drive us to consider a fine-tuning of K⁺ concentration regulation. The concentration of K⁺ is measured by the folding of DNAzyme. This molecule has the functional characteristics of a protein, because it is able to catalyze the peroxidation reaction but it is structurally different from a protein. To permit such catalytic activity, guanine-rich oligonucleotides are folded in G-quadruplex structure, which can bind hemin molecule. The DNAzyme formation is not possible without suitable concentrations of K⁺ ion. From the amount of DNAzyme we can estimate how much K⁺ ion is present in the solution. The DNAzyme formation and quantification is determined by UV-VIS spectroscopy.

DNAzyme formation has been measured also in presence of K:D-Rib 5mM allowing the use of DNAzyme as potassium concentration sensor. Measures on cell medium, before and after treatment, have been done. Preliminary results indicate that the extracellular medium of HTB-126 treated with K:D-Rib 5mM has a lower DNAzyme concentration, compared to reference solution of K:D-Rib 5mM. This could demonstrate that an amount of K⁺ ion enters inside the cell.

RILASCIO DI INTERFERENTI ENDOCRINI IN ALIMENTI INSCATOLATI: IL CASO DEL BISFENOLO A

Bianco M.^(1,2,3), Errico S.⁽¹⁾, Mita L.^(1,2), Catapane M.⁽¹⁾, Gallo P.⁽³⁾, Romano Carratelli C.⁽¹⁾, Mita D.G.^(1,2), Diano N.^(1,2)

(1) Seconda Università di Napoli, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Via Costantinopoli, 16 - 80138 Napoli

(2) Consorzio INBB, Viale Medaglie d'Oro 305, 80135 - Roma

(3) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno

Gli Interferenti Endocrini (IE) sono una categoria eterogenea di sostanze xenobiotiche che interferiscono con il sistema endocrino ed in particolare con l'omeostasi degli ormoni sessuali e tiroidei. Il bisfenolo A 2,2-bis(4-idrossifenil)propano (BPA) è un interferente endocrino utilizzato nella fabbricazione di materiali polimerici, incluse le resine epossidiche. Le resine epossidiche hanno trovato un vasto utilizzo nelle industrie, specialmente in quella del packaging alimentare.

Sulla base di tali considerazioni lo scopo del presente studio è stato quello di determinare e quantificare il rilascio di bisfenolo A in alimenti da contenitori metallici. A questo scopo sono stati utilizzati alimenti conservati in lattine rivestite internamente da resine epossidiche. Tutti i campioni analizzati sono stati sottoposti ad un trattamento a tre diverse temperature: a 27 °C per simulare le condizioni di una buona conservazione, a 37 °C per simulare un cattivo trasporto ed una cattiva conservazione, ed a 45 °C per simulare conservazioni di pessima conservazione. Inoltre un gruppo di lattine dello stesso lotto è stato ammaccato al fine di valutare l'incremento del rilascio di BPA in seguito alla lesione della resina epossidica. Le concentrazioni di BPA sono state determinate mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC). I cibi inscatolati esaminati sono stati: pomodori pelati, pomodorini, concentrato di pomodoro, tonno in olio d'oliva o al naturale, mais. Per la misurazione del "rilascio limite" del BPA sono state condotte prove di laboratorio utilizzando i solventi simulanti, in accordo con la direttiva 82/711/CEE. Tutti i campioni hanno rilevato un rilascio di BPA dalla resina epossidica nell'alimento già a 25 °C. La concentrazione di BPA rilevata è maggiore nel pomodoro e nel tonno conservato in olio. Dopo un' incubazione del campione a 37°C e a 45°C per un tempo di 24 ore è possibile osservare un aumento esponenziale del rilascio di bisfenolo A al variare della temperatura. Confrontando il rilascio di bisfenolo A da contenitori di alimenti integri ed ammaccati della stessa marca, la concentrazione di bisfenolo A misurata all'HPLC risulta centinaia di volte superiore rispetto a quella rilasciata dal contenitore integro.

La misurazione del rilascio limite di BPA utilizzando il solvente simulante specifico ed eseguita a 100°C per 1h mostra un notevole incremento del rilascio. Nel caso dei contenitori di tonno conservati in olio ed ammaccati il limite di migrazione specifica del BPA, pari a 0.6mg/Kg, viene superato.

PROGNOSTIC IMPACT OF MGMT PROMOTER METHYLATION IN 27 GLIOBLASTOMA PATIENTS TREATED WITH TEMOZOLAMIDE

Farace Cristiano and Madeddu Roberto

Dept. Biomedical Sciences, University of Sassari, Italy

cfarace@uniss.it

Aim

Glioblastoma (GBM), the most common primary brain tumor in adults, is a rapidly progressive and fatal disease as indicated by a median overall survival of less than 1 year in a population-based study. Assessment of promoter methylation of the O 6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) gene has recently gained importance in molecular profiling of this pathology. Although epigenetic silencing of the MGMT gene promoter has been associated with prolonged survival in glioblastoma patients it is unclear if their determination will be an important prognostic marker and/or a predictive marker for response to temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma. In order to help determine this possible connection we analyze MGMT promoter and survival in patients with GBM.

Methods

Twenty-seven patients with GBM, treated with TMZ were analyzed for MGMT promoter methylation. All patients were treated with TMZ followed with radiotherapy. Genomic DNA was isolated from FFPE samples obtained previous to treatment. MGMT promoter methylation was determined by methylation-specific PCR after bisulfite treatment. Progression survival was calculated according to the Kaplan–Meier method.

Results and Conclusion: MGMT promoter was methylated in 11 patients (41%) and unmethylated in 16 patients (59%). Significant correlation was observed between MGMT promoter methylation and patients survival treated with TMZ ($P = 0.002$ by the log-rank test). The results of the present study suggest that the determination of MGMT promoter methylation status might be a predictive/prognostic biomarker in the treatment of patients with GBM and that the methods employed for its assessment could be used to therapeutic decision.

EFFETTI DEGLI ALCHILFENOLI SU LINEE CELLULARI DI PROSTATA UMANA

Maurizio Forte

Nei Paesi industrializzati, gli uomini sono continuamente esposti a molteplici sostanze chimiche presenti nell'ambiente e nei prodotti di uso quotidiano, delle quali non sono pienamente caratterizzati i potenziali effetti sulla salute umana. Tra queste, suscita particolare interesse un gruppo di sostanze noto come Endocrine disrupting chemicals (EDCs), in grado di interferire, anche a bassissime concentrazioni, con numerose funzioni endocrine. Gli EDCs esercitano la loro azione principalmente tramite recettori ormonali nucleari, come recettori degli estrogeni (ER), degli androgeni (AR), del progesterone e degli ormoni tiroidei (TR). Il gruppo di molecole classificato come EDCs è altamente eterogeneo e comprende farmaci o estrogeni sintetici, fitoestrogeni, pesticidi, plastificanti, diossine, fenoli, etc.

Gli alchilfenoli (AP) rappresentano una delle categorie più interessanti di EDCs, in considerazione sia della potenziale esposizione dell'uomo che della loro dimostrata attività estrogenica; si formano nell'ambiente o negli impianti di trattamento delle acque reflue per degradazione dei rispettivi alchilfenoli polietossilati, composti largamente utilizzati in numerose applicazioni industriali, principalmente come tensioattivi o come anti-ossidanti. Il nonilfenolo (NP) e l'octilfenolo (OP) sono di gran lunga i composti più importanti commercialmente tra gli alchilfenoli; mostrano attività estrogenica in vari test sia *in vitro* che *in vivo*.

Considerati i rischi sulla salute umana degli EDCs, lo scopo della mia attività di ricerca è quello di valutare gli effetti del nonilfenolo e dell'octilfenolo su differenti linee cellulari di prostata umana: cellule epiteliali prostatiche umane non tumorali (PNT1A) e cellule di carcinoma prostatico umano (LNCaP), andando a determinare i possibili effetti tossici e i pathways molecolari attivati o inibiti da questi due interferenti endocrini. La prostata è la più importante ghiandola accessoria sessuale nei maschi, la cui funzione è necessaria per la fertilità maschile; la crescita e lo sviluppo di questa ghiandola è controllata generalmente dagli androgeni; tuttavia, in letteratura è suggerito in questi processi un ruolo di uguale importanza svolto dagli estrogeni. E' quindi ipotizzabile che gli alchilfenoli, andando a mimare l'azione degli estrogeni, possano esercitare degli effetti sulla prostata, mettendone a rischio la sua corretta funzionalità e causandone stati patologici, incluso il cancro. Attraverso saggi MTT abbiamo valutato l'effetto degli alchilfenoli, singolarmente o in miscela, sulla proliferazione cellulare; mediante tecniche di immunofluorescenza è stato visto come cambia la localizzazione dei recettori per gli estrogeni ER α e ER β in seguito al trattamento con gli alchilfenoli e con saggi ELISA come cambia la loro espressione. I nostri dati hanno mostrato un effetto simil- estrogenico degli alchilfenoli sulle PNT1A, con stimolo della proliferazione cellulare in maniera dose-dipendente; inoltre abbiamo visto che il recettore ER α degli estrogeni trasloca dal citoplasma al nucleo in seguito al trattamento con il nonilfenolo.

BISFENOLO A ED OBESITÀ (I): MISURA DEI LIVELLI URINARI IN SOGGETTI OBESI IN ETÀ PEDIATRICA

Nicolucci C^{1,2}, Rossi S³, Catapane M^{1,2}, Menale C^{1,3}, Miraglia E⁴, Perrone L⁴, Mita DG^{1,2,3}, Diano N.^{1,2,3}

1. Dip. Medicina Sperimentale, Seconda Università degli Studi di Napoli

2. Consorzio Interuniversitario Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi (INBB), Roma

3. Istituto di Genetica e Biofisica "ABT"- CNR, Napoli

4. Dip. Pediatria, Seconda Università degli Studi di Napoli

Il composto organico bisfenolo A (BPA), con una produzione annua di 2–3 milioni di tonnellate, è un mattone fondamentale nella sintesi di plastiche e additivi plastici. Sospettato di essere dannoso per l'uomo sin dagli anni ottanta, le preoccupazioni sull'uso del BPA hanno avuto risalto sui media nel 2008, quando molti governi hanno incentivato studi sulla sua sicurezza ed hanno vietato la vendita di prodotti che lo contenevano, soprattutto quelli per i bambini, come biberon e giocattoli. In particolare il BPA, classificato come Interferente Endocrino, sembra essere imputato in numerose malattie a carico dell'apparato cardiaco, riproduttore, della prostata e della mammella. Il National Institute of Environmental Health Sciences degli USA ha prodotto nell'aprile 2008 una bozza di valutazione del rischio per la salute umana conseguente all'esposizione complessiva attraverso gli alimenti, i prodotti di consumo e l'ambiente di vita. Il documento ha comparato gli effetti del BPA negli studi sperimentali, e le relative relazioni dose-risposta, con le informazioni disponibili sui livelli di esposizione umana, compresi gli studi, tuttora limitati, di epidemiologia e monitoraggio biologico. Gli studi condotti mostrano una chiara evidenza di effetti endocrini e consentono di definire una dose massima tollerabile giornaliera (TDI) di 0.05 mg/kg p.c.

I neonati ed i bambini nutriti con alimenti liquidi sono tra i più esposti, e quelli alimentati con cibi contenuti in bottiglie di policarbonato possono assumere fino a 13 µg di BPA per kg p.c. al giorno. Nel 2009, uno studio ha trovato che bere da bottiglie in policarbonato determina un aumento dei livelli urinari di BPA di due terzi, passando da 1,2 µg/g creatinina a 2 µg/g creatinina. Di conseguenza, nascono forti preoccupazioni per il rischio di effetti a lungo termine sullo sviluppo endocrino, neurocomportamentale e riproduttivo in seguito ad esposizione in utero e/o durante l'infanzia. Studi recenti si stanno focalizzando anche sulla correlazione tra esposizioni prolungate durante l'adolescenza ed un maggior rischio di obesità.

In questa prospettiva si è inserito lo studio da noi condotto che ha coinvolto più di 100 bambini residenti nella Regione Campania, che presenta il 48.8% di persone con eccesso di peso in età compresa tra 6 e 11 anni. Lo scopo del lavoro è stato stimare la quantità di BPA nelle urine dei bambini obesi e normopeso, per valutare una correlazione tra questo interferente endocrino e l'obesità infantile.

I livelli urinari di BPA sono stati determinati mediante HPLC, esplorando le potenzialità offerte dai diversi sistemi di rivelazione: spettrofotometria UV/Vis a lunghezza d'onda variabile, spettrofluorimetria e spettrometria di massa. È stata necessaria una fase di preparazione del campione a monte della determinazione strumentale che ha avuto lo scopo di trasferire l'analita di interesse dalla matrice biologica ad una soluzione, più concentrata, compatibile con le opportune tecniche di rivelazione sensibili e selettive. In particolare l'analisi ha previsto due fasi: l'idrolisi enzimatica per deglucuronare il BPA e l'estrazione in fase solida con recupero in solvente puro.

I valori ottenuti sono stati analizzati in funzione di parametri quali: sesso, peso, altezza, circonferenza vita, indice di massa corporea (BMI), Z-score BMI e l'indice di insulina resistenza (HOMA-IR). Dalle analisi effettuate, facendo riferimento al valore dello Z-score BMI, il valore medio di concentrazione di BPA nelle urine di bambini obesi è risultato essere pari a 0.58 ng/mL mentre per i bambini normopeso il valore medio è risultato essere pari a 0.53 ng/mL. Analizzando i

dati in relazione alla differenza di genere risulta che la concentrazione media di BPA nelle femmine obese è il 44% maggiore di quella delle non obese; la concentrazione media di BPA nei maschi obesi è il 90% maggiore di quella dei non obesi. Le concentrazioni di BPA nei maschi obesi, inoltre, sono maggiori del 20% dei corrispondenti valori nelle femmine obese. Invece nei normopeso, la differenza di concentrazione di BPA nei due sessi è irrilevante.

Oggetto di opportuno approfondimento, alla luce anche dei risultati ottenuti con gli esperimenti *in vitro* su adipociti umani differenziati e trattati con BPA, è l'esistenza di una forte correlazione tra i livelli urinari di BPA e l'HOMA-IR nelle urine dei bambini obesi di sesso maschile, ossia una più elevata esposizione al BPA A determina l'aumento dell'indice di insulino-resistenza e quindi aumenta la predisposizione al diabete di tipo II per i maschi obesi.

HEME OXYGENASE 1 AND HEME OXYGENASE 2 AS DRUGGABLE TARGETS: DOCKING AND TWO HYBRID SYSTEM TO IDENTIFYING AND CHARACTERIZING PROTEIN-PROTEIN AND PROTEIN-LIGAND INTERACTIONS[§]

Morena Pappalardo¹, Livia Basile², Salvatore Guccione^{1,2}

¹Dipartimento di Scienze del Farmaco -Università degli Studi di Catania- V.le Andrea Doria 6 Ed. 2, 95125 Catania;

²Etnalead s.r.l., c/o EtnaBuilding, Scuola Superiore di Catania-Università degli Studi di Catania- via S. Nullo 5/i, 95123 Catania.

[§]Part of M.P.'s graduation thesis.

Experimental data were combined with *in silico* approaches to study both the binding of Heme-Oxygenase (HO)-1 and -2 inhibitors [1] and the interaction of both the isozymes with Adiponectin [2].

Heme Oxygenases (HO) belong to the oxidoreductases. These enzymes are involved in a lot of anti-inflammatory processes.

HO-1 is the HO induced isoform, activated in response to cellular stress and oxidative stimuli. HO-1 inhibition has been suggested as a new therapeutic strategy for chemotherapy, radiotherapy or photodynamic therapy for chronic myeloid leukemia, colon carcinoma, adenocarcinoma, pancreatic cancer and melanoma.

HO-2 contributes to basal physiological functions, including renal channel activity, transport, and vascular tone. Its distribution regulates many heme proteins, such as cyclooxygenase, nitric oxide synthase and thromboxane synthase. The HO-2 isozyme is essential in regulating physiological levels of ROS (Reactive Oxygen Species) and it takes an important role in diabetes and obesity.

Imidazole and 1,2,4 triazole based compounds were tested as possible inhibitors for HO-1. Docking simulations were carried out using the software Molegro Virtual Docker (MVD) [1]. Pharmacophore modeling was carried out by the software Ligand Scout [1].

Both the docking calculations and the Pharmacophoric models proved the existence of different binding modes with the **imidazole-heme iron as a governing factor**. New compounds are also going to be synthesized and experimentally tested [1]. The *in silico* screening was extended to a HO-2 homology model, built from the crystal structure of HO1 (pdb code = 3CZY) as the template by the Swiss-Model server. Residues of the HO-2 binding pocket are highly conserved with respect to the HO-1 ones; therefore a quite similar ranking as for HO-1 was obtained.

Adiponectin is a cytokine regulating some metabolic processes including the glucose regulation and the fat acids catabolism. A possible role of HO-2 in the maturation process of Adiponectin was previously suggested: the secretion of this cytokine is controlled by molecular chaperones in the endoplasmic reticulum and, in light of this, a chaperon-like behavior for the HO-2 enzyme was supposed; experimental results show a major role of the HO-2 in the regulation of adipogenesis, acting as a heat shock protein [2].

HO-2 and Adiponectin docking simulations were carried out using FireDock (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/FireDock/>) [2]. Docking scores were refined by PatchDock (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>) [2].

Docking results therefore contact regions were experimentally validated by the Two Hybrid System assay.

An *ad hoc* BacterioMatch system protocol was followed, using Bacteria E. Coli. This protocol allows a better growth of colonies, a higher efficiency for the transformation, profitable isolation of plasmid DNA and reduction of the possibility of false positives.

Multiple regions seem to be involved in target recognition and binding process between the two proteins [2].

The reported findings can reflect in novel therapeutics. What is particularly exciting is that revealing information about protein–protein interactions could provide the targets for a generation of new drugs. Many diseases can be treated by designing new drugs to inhibit or activate the protein-protein interactions, where the knowledge of the protein-protein complex structures is essential.

Establishing interactive links between virtual and experimental approaches can help in unravelling biological interactions and finally speed the drug discovery process.

References:

- i)[1] V. Sorrenti, S. Guccione, C. Di Giacomo, M.N. Modica, V. Pittalà, R. Acquaviva, L. Basile, M. Pappalardo, L. Salerno, “*Evaluation of Imidazole-based Compounds as Heme Oxygenase-1 inhibitors*”, *Chemical Biology & Drug Design* (2012). doi: 10.1111.
- ii)[2] L. Vanella, G. Li Volti, S. Guccione, G. Rappazzo, E. Salvo, M. Pappalardo, N.G. Abraham, “*Heme Oxygenase 2/Adiponectin Protein-Protein Interaction in Metabolic Syndrome*”, submitted.

LE (NANO)BIOTECNOLOGIE PER IL RILASCIO CONTROLLATO DI FARMACI NELLA TERAPIA DEL MESOTELIOMA PLEURICO

Piccolo M.T. (1,3), **Menale C.** (1,2), **Diano N.** (1,2,3), **Mita D.G.** (1,2,3), **Favicchia I.**(3), **Crispi S.** (1)

1. Istituto di Genetica e Biofisica "Adriano Buzzati Traverso" - CNR, Napoli

2. Dipartimento di Medicina Sperimentale, II Università degli Studi di Napoli

3. Consorzio interuniversitario Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, INBB, Roma

Il mesotelioma pleurico è un tumore maligno, correlato principalmente all'esposizione all'amianto, che si manifesta anche dopo un lungo periodo di latenza. I protocolli internazionali per la cura del mesotelioma pleurico prevedono la chirurgia, la radioterapia e la chemioterapia, singolarmente o in combinazione tra loro. Nessuno di questi approcci, però, risulta risolutivo, ma solo palliativo. Con riferimento alla terapia chemioterapica, il farmaco di elezione è il cisplatino.

In generale la dose di un farmaco somministrato in forma libera è superiore alla dose corrispondente al limite terapeutico di efficacia ed inoltre la concentrazione del farmaco nell'organismo in breve tempo raggiunge valori al di sotto della soglia di efficacia. Per migliorare i limiti della somministrazione farmacologica classica si è deciso di studiare forme di rilascio controllato capaci di liberare il farmaco lentamente ed in dosi efficaci per lungo tempo.

Come veicolo, sono state realizzate e caratterizzate nanoparticelle di acido poli (lattico-glicolico), PLGA.

La scelta di utilizzare questo copolimero è dovuta al fatto che i suoi prodotti di degradazione, l'acido lattico e l'acido glicolico, sono biocompatibili in quanto prodotti naturali del metabolismo cellulare animale.

Per stabilire l'efficacia delle nanoparticelle è stato effettuato uno studio utilizzando come farmaco il cisplatino e come sistema di mesotelioma la linea cellulare di mesotelioma pleurico umano MSTO-211H. Un primo studio ha riguardato l'uptake delle nanoparticelle di PLGA senza farmaco da parte delle MSTO-211H mediante microscopia a fluorescenza ed è stato osservato che le nanoparticelle attraversano la membrana cellulare e sono evidenti nella zona perinucleare.

Successivamente le nanoparticelle di PLGA sono state caricate con il farmaco ed è stata studiata la cinetica di rilascio del cisplatino in soluzione fisiologica per 336 ore (14 giorni), individuando tre fasi: una prima fase della durata di tre ore che presenta un'elevata velocità di rilascio (8.2 µg/h); una seconda fase lunga quattro giorni con diminuita velocità (0.16 µg/h), ed un'ultima fase che presenta una bassa velocità di rilascio pari a 0.04 µg/h.

Dopo queste prove preliminari, è stato studiato l'effetto citotossico delle nanoparticelle contenenti cisplatino, in funzione della concentrazione del farmaco (0, 5 e 10 µg/mL) e del tempo (0-72 h). Quindi è stata analizzata la sopravvivenza cellulare e la variazione di espressione della caspasi-3 e di p53, due proteine effettrici della apoptosi. I risultati hanno permesso di evidenziare che la sopravvivenza cellulare e l'espressione delle proteine indotta dalle nanoparticelle sono funzione della dose del farmaco utilizzata ed inoltre i risultati sono paragonabili a quelli ottenuti con il farmaco libero indicando così l'efficacia terapeutica del sistema nanoparticelle PLGA-cisplatino.

Recentemente è stato dimostrato che il piroxicam, un farmaco antinfiammatorio non steroideo, somministrato in forma libera insieme al cisplatino, ha un effetto sinergico perché aumenta la sensibilità delle cellule tumorali al trattamento con il cisplatino. Si è deciso quindi di valutare l'efficacia delle nanoparticelle contenenti cisplatino utilizzando il doppio trattamento nelle stesse condizioni sperimentali e con lo stesso sistema cellulare utilizzato per i farmaci liberi alle concentrazioni già riportate in letteratura.

In particolare è stato utilizzato: a) cisplatino incapsulato alla concentrazione di 10 µg/ml; b) cisplatino libero alla concentrazione di 576 µg/mL; c) cisplatino incapsulato (10 µg/ml) + piroxicam libero (576 µg/ml) d) cisplatino libero alla concentrazione di 10 µg/ml + piroxicam libero (576 µg/ml). Oltre alla sopravvivenza cellulare, all'attività della caspasi-3 ed all'espressione della

proteina p53, nel doppio trattamento si è monitorata anche l'espressione di p21 e HtrA1, due proteine correlate al ciclo cellulare e quindi all'apoptosi.

I risultati sperimentali mostrano l'efficacia del doppio trattamento anche quando il cisplatino è incapsulato nelle nanoparticelle confermando così l'efficacia biologica delle nanoparticelle nella veicolazione di farmaci.

Sono in corso di progettazione studi mirati a sperimentare in vivo questo trattamento basato sull'uso di nanoparticelle contenenti cisplatino per poter valutare la loro efficacia utilizzando modelli murini di mesotelioma.

NRF2 TRANSCRIPTION FACTOR ACTIVATION MODULATES ENDOTHELIAL INFLAMMATORY RESPONSE TRIGGERED BY TNF-ALPHA

*Antonio Speciale**, *Sirajudheen Anwar**, *Deborah Fratantonio**, *Andrea Azzerboni****, *Antonella Saija**, *Fabio Virgili***, *Francesco Cimino**

**Dep. Farmaco-Biologico, School of Pharmacy, University of Messina, Viale Annunziata, 98168, Messina, Italy*

***National Research Institute on Food and Nutrition (INRAN), Rome, Italy*

****OU of Obstetrics & Gynecology, Policlinico Universitario "G. Martino", Messina, Italy*

Oxidants are one of the etiologies of multiple diseases and disorders. Cells are continuously exposed to the deleterious consequences of reactive oxygen species generated endogenously and exogenously. However, cells have developed multiple stress adaptive responses, including the system regulated by the transcription factor Nrf2 that modulates a set of cytoprotective genes (such as HO-1, NQO1, γ -GCS). Up today there are few data supporting the atheroprotective and anti-inflammatory activity of the Nrf2 pathway in endothelial cells. Since activation of endogenous cellular defense mechanisms can represent an innovative approach to therapeutic intervention in pathological conditions characterized by chronic tissue damage, a better understanding of adaptive response mechanisms at the cellular and molecular levels can lead to novel strategies for the prevention and treatment of many different diseases. Thus, to test the potential atheroprotective and anti-inflammatory role of the Nrf2 pathway we have investigated if some changes in the intracellular redox status, such as those related to endogenous antioxidants depletion, might be able to alter the response to the inflammatory cytokine TNF- α in cultured human endothelial cells through the activation of this pathway.

In this study, we revealed that an oxidative intracellular status consequent to an intracellular glutathione depletion induced by HUVECs exposure to buthionine sulfoximine (BSO), an inhibitor of γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS), a rate-limiting enzyme in glutathione biosynthesis, is able to induce a cellular adaptive response. Interestingly we demonstrated that, in our experimental conditions, activation of Nrf2 pathway is able to reduce endothelial dysfunction by decreasing NF- κ B nuclear translocation and adhesion molecules gene expression in HUVECs. Furthermore, we confirmed that Nrf2 nuclear translocation activated by GSH depletion is dependent on extracellular signal-regulated kinases 1/2 phosphorylation. In conclusion, we showed that the coordinate induction of endogenous cytoprotective proteins through activation of the Nrf2 pathway might serve as a new therapeutic approach for prevention or treatment of endothelial dysfunction.

Corresponding author: Antonio Speciale (specialea@gmail.com)

VALIDATION OF THE MBS METHOD

¹Giorgia Bottini, ¹Francesca Losito, ¹Aly Alexandra Arienzo, ²Francesca Romana Priolisi, ²Alberto Mari and ¹Giovanni Antonini

¹Department of Biology, University Roma Tre, 00146 Rome, Italy

²MBS srl, 00131 Rome, Italy

Corresponding Author: Prof. Giovanni Antonini, Department of Biology, University Roma Tre, 00146 Rome, Italy, Tel: +39-3290570913; *E-mail:* giovanni.antonini@uniroma3.it

Food borne pathogens are a growing concern for human safety. In this context, MBS srl (a spin-off of Roma Tre University, Rome, Italy) has developed an alternative method, called Micro Biological Survey (MBS) method. The MBS method is a rapid alternative method for the detection and selective counting of bacteria in agro-food, in water and in environmental samples. It is based on colorimetric survey performed in mono-use disposable reaction vials in which samples can be inoculated without any preliminary treatment (eg. homogenization, dilution, etc.); the greater the number of bacteria in the sample, the faster the color of the reaction vial changes. The objective of this study was the primary validation, in accord with ISO 16140 (2003), of the qualitative Micro Biological Survey (MBS) method for *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. and the quantitative Biological Survey (MBS) method for Total Viable Count (TVC), *Escherichia coli* (*E. coli*), Enterobacteriaceae and *Staphylococcus aureus*. Validation aims to compare the results obtained with an alternative method, in this case the MBS method, with the results obtained with the reference method. To verify the equivalence between the two methods different parameters were analyzed: selectivity, relative accuracy, relative specificity and relative sensitive for the qualitative validation of the MBS method for *Salmonella* spp. and *Listeria* spp.; selectivity, linearity and accuracy for the quantitative validation of the MBS method for Enterobacteriaceae and *Staphylococcus aureus*. The validation has shown that the MBS method gives similar results and is in agreement with the reference methods. The MBS method can therefore represent a worthy aid in food screening without replacing the analysis carried out with traditional methods which are very precise though often long and complex.

UNITÀ DI RICERCA

DEL

CONSORZIO INTERUNIVERSITARIO

“ISTITUTO NAZIONALE BIOSTRUTTURE E BIOSISTEMI”
(in ordine alfabetico del nome del Responsabile Scientifico)

*(PO Professore Ordinario, PA Professore Associato, RU Ricercatore Universitario, DR
Dottorando di Ricerca; BC Borsista, Contrattista; PT Personale Tecnico; A Altro)*

UNITA' DI RICERCA INBB
Roma

RESPONSABILE SCIENTIFICO

ANTONINI GIOVANNI

Linea di Ricerca

Struttura, funzione ed applicazioni biotecnologiche di proteine ed enzimi

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Antonini Giovanni PO giovanni.antonini@uniroma3.it

Non Aderenti INBB

Giansanti Francesco RU francesco.giansanti@cc.univaq.it

Mari Alberto A a.mari@emmebiesse.net

Leboffe Loris BC lleboffe@uniroma3.it

Bottini Giorgia DR g.bottini@emmebiesse.net

Priolisi Francesca Romana BC fr.priolisi@emmebiesse.net

Losito Francesca DR francescalos@hotmail.com

Arienzo Alyxandra BC sashotta@hotmail.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Dipartimento di Biologia, Università Roma Tre, v.le Marconi 446, 00146 Roma,

tel. +39.06.5733.6233

fax +39.06.5733.6405

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Roma

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

- Correlazione struttura.funzione e meccanismi molecolari alla base della attività di proteine ed enzimi
- Comprensione dei meccanismi molecolari alla base della attività protettiva della lattoferrina
- Applicazioni biotecnologiche dello studio di enzimi redox batterici

Risultati ottenuti

- Sono stati delucidati i meccanismi molecolari alla base del ruolo della emopessina nel controllo della concentrazione dell'NO ed meccanismi molecolari alla base della attivazione del pro-farmaco brostacillina da parte della glutathione transferasi.
- Sono state sviluppate e comprovate nuove ipotesi sul meccanismo molecolare della attività antivirale ed antiparassitaria della lattoferrina.
- E' stato sviluppato un metodo per la rilevazione e conta selettiva dei microrganismi basato sul dosaggio colorimetrico della attività di enzimi redox batterici. Tale ricerca ha portato nel 2007 alla costituzione del primo spin-off dell'Università Roma Tre ed ha usufruendo di un finanziamento MIUR ex art. 11 DM 593/00. Nel 2008 è stato concesso il relativo brevetto internazionale (WO2008007206)

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

Silvia Pezzola, Giovanni Antonini, Cristina Geroni, Italo Beria, Maristella Colombo, Massimo Broggin, Nicola Mongelli, Loris Leboffe, Robert MacArthur, Alessia Francesca Mozzi, Giorgio Federici and Anna Maria Caccuri
Role of glutathione transferases in the mechanism of brostallucin activation.
Biochemistry; 49:226-235, 2010 DOI: 10.1021/bi100755e

Raffaele Fabrini, Alessio Bocedi, Kutayba F. Dawood, Paola Turella, Lorenzo Stella, Michael W. Parker , Jens Z. Pedersen , Giorgio Federici, Giovanni Antonini, Giorgio Ricci
The extended catalysis of glutathione transferase.
FEBS Lett. 585:341-345, 2011 doi:10.1016/j.febslet.2010.12.009

Giorgia Bottini, Francesca Losito, Alessio De Ascentis, Francesca Romana Priolisi, Alberto Mari and Giovanni Antonini
Validation of the Micro Biological Survey Method for Total Viable Count and E. coli in Food Samples
American Journal of Food Technology , 6:951-962, 2011 DOI: 10.3923/ajft.2011.951.962 2011

Francesco Giansanti, Loris Leboffe and Giovanni Antonini
Antiviral Activity of Lactoferrin and Ovotransferrin Derived Peptides Towards Herpesviridae
"Herpesviruses", Intech Open Access Publisher, Rijeka, Croatia, 2011 ISBN 978-953-307-750-5

Alberto Mari, Maria Teresa Massucci and Giovanni Antonini
Colorimetric method and relative device for bacterial load detection
World Patent Number: EP2041297 B1 Publication date: 26.10.2011

Francesco Giansanti, Loris Leboffe, Giuseppina Pitari, Rodolfo Ippoliti and Giovanni Antonini
Physiological roles of ovotransferrin.
Biochim Biophys Acta. 1820: 218–225, 2012 DOI 10.1016/j.bbagen.2011.08.004

Francesca Losito, Giorgia Bottini, Alessio De Ascentis, Francesca Romana Priolisi, Alberto Mari, Gianfranco Tarsitani and Giovanni Antonini
Qualitative and Quantitative Validation of the Micro Biological Survey Method for *Listeria* spp., *Salmonella* spp., Enterobacteriaceae and *Staphylococcus aureus* in Food Samples
American Journal of Food Technology , 7: 340-351, 2012 DOI: 10.3923/ajft.2012.340.351

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Nei prossimi tre anni continueranno le linee di ricerca già in corso su:

- Correlazione struttura.funzione e meccanismi molecolari alla base della attività di proteine ed enzimi
- Comprensione dei meccanismi molecolari alla base della attività protettiva della lattoferrina
- Applicazioni biotecnologiche dello studio di enzimi redox batterici

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

- Molecular Genetics Group, John Curtin School of Medical Research, Australian National University, Canberra ACT 2601, Australia,
- Biota Structural Biology Laboratory, St Vincent's Institute of Medical Research, 9 Princes Street, Fitzroy, Victoria 3065, Australia,
- Department of Chemistry and Biochemistry, Massey University, Palmerston North, New Zealand

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

Strumentazione per microscopia (microscopi ottici, a fluorescenza, confocale, a forza atomica, elettronici a trasmissione e a scansione)

Strumentazione per biochimica (spettrofluorimetro, ultracentrifuga analitica, stopped-flow, HPLC, workstation)

PAROLE CHIAVE

Correlazione struttura e funzione di proteine

Enzimologia

Lattoferrina

Biotecnologia

Metodi microbiologici rapidi

UNITA' DI RICERCA INBB
Sassari

RESPONSABILE SCIENTIFICO

BAGELLA LUIGI MARCO

LINEE DI RICERCA

Ruolo dei complessi Cdk9/CiclinaT2 nel differenziamento muscolare

Ruolo di EZH2 nella carcinogenesi del Rbdomiosarcoma.

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Bagella Luigi Marco

PA

lbagella@uniss.it

Gaspa Leonardo

PO

lgaspa@uniss.it

Non Aderenti INBB

Marchesi Irene

BC

iremarchesi@gmail.com

Contini Gianni

DR

gcontini@uniss.it

Doneddu Valentina

DR

vdoneddu@uniss.it

Nieddu Valentina

DR

vnieddu@uniss.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Dept. of Biomedical Sciences, Viale San Pietro 43/b, 07100 Sassari, Italy

Tel: +39079228274

Mobile: +393204299701

Fax: +39079228120

lbagella@uniss.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA:

Genova

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

La comprensione dei meccanismi molecolari che determinano la perdita permanente da parte delle cellule di poter differenziare, rappresenta un passo fondamentale per la comprensione del fenomeno tumorale. I risultati di questo studio portano a una maggiore comprensione dei pathways che regolano il differenziamento e permettono l'individuazione di alterazioni molecolari a danno del sistema muscolare.

Le attività di ricerca svolte negli ultimi tre anni hanno permesso inizialmente di studiare i complessi Cdk9/Ciclina T2 durante il differenziamento muscolare con lo scopo di caratterizzare le due isoforme delle cicline T2 chiarendo il ruolo delle due proteine nelle diverse fasi della miogenesi. In seguito, le attività di ricerca hanno riguardato lo studio del Rbdomiosarcoma, un tumore che si origina da un mancato differenziamento del muscolo scheletrico che porta a una proliferazione incontrollata. E' stato analizzato il ruolo di uno dei principali complessi responsabili delle modifiche epigenetiche legate al differenziamento e alla carcinogenesi: Il complesso PRC2 e la sua subunità catalitica EZH2. In particolare le attività svolte hanno permesso di chiarire i meccanismi EZH2-dipendenti che portano all'inibizione dell'attività dei principali enzimi coinvolti nel processo di differenziamento muscolare, quali MyoD e il complesso Cdk9-CiclinaT2. E' quindi possibile supporre che il complesso PRC2 svolga un ruolo fondamentale nella carcinogenesi del Rbdomiosarcoma. Infatti, la presenza di EZH2 in cellule di RMS impedisce a MyoD e a tutti i fattori di attivazione trascrizionale di legarsi e attivare i promotori muscolo-specifici portando a un'inibizione del processo differenziativo e all'insorgenza del tumore.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

1 D'Urso V., Collodoro A., Mattioli E., Giordano A., Bagella L. Cytometry and DNA Ploidy: Clinical Uses and Molecular Perspective in Gastric and Lung Cancer. (2010) J Cell Physiol 222(3): 532-9. **(Affiliazione al Consorzio)**

2 Federico M., Symonds C.E., Bagella L., Rizzolio F., Fanale D., Russo A., Giordano A. R-Roscovitine (Seliciclib) prevents DNA damage-induced cyclin A1 upregulation and hinders non-homologous end-joining (NHEJ) DNA repair. (2010) Mol Cancer 4;9:208. **(Affiliazione al Consorzio)**

3 Alessio N., Squillaro T., Cipollato M., Bagella L., Giordano A. and Galderisi U. The BRG1 ATPase of chromatin remodelling complexes is involved in modulation of mesenchymal stem cell senescence through RB-P53 pathways. (2010) Oncogene 29(40):5452-63. **(Affiliazione al Consorzio)**

4 Maioli M., Santaniello S., Montella A., Bandiera P., Cantoni S., Cavallini C., Bianchi F., Lionetti V., Rizzolio F., Marchesi I., Bagella L., Ventura C. Hyaluronan esters drive smad gene expression and signaling enhancing cardiogenesis in mouse embryonic and human mesenchymal stem cells. (2010) PLoS One. 5(11): e15151. **(Affiliazione al Consorzio)**

- 5 Federico M., Bagella L. Histone deacetylase inhibitors in the treatment of hematological malignancies and solid tumors. (2011) *J Biomed Biotechnol.*475641. (**Affiliazione al Consorzio**)
- 6 Fiorentino F.P., Macaluso M., Miranda F., Montanari M., Russo A., Bagella L., Giordano A. CTCF and BORIS Regulate Rb2/p130 Gene Transcription: A Novel Mechanism and a New Paradigm for Understanding the Biology of Lung Cancer. (2011) *Mol Cancer Res.* Feb;9(2):225-33. (**Affiliazione al Consorzio**)
- 7 Rizzolio F., Lucchetti C., Caligiuri I., Marchesi I., Caputo M., Klein-Szanto A.J., Bagella L., Castronovo M., Giordano A. Retinoblastoma tumor-suppressor protein phosphorylation and inactivation depend on direct interaction with Pin1. (2012) *Cell Death Differ.* Feb;10. doi: 10.1038/cdd.2011.202. (**Affiliazione al Consorzio**)
- 8 Marchesi I., Fiorentino F.P., Rizzolio F., Giordano A., Bagella L. The ablation of Ezh2 uncovers its crucial role in the rhabdomyosarcoma formation. (2012) *Cell Cycle* (accepted after revision). (**Affiliazione al Consorzio**)

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Obiettivi futuri saranno quelli di studiare le alterazioni genetiche ed epigenetiche di EZH2 nel processo di formazione del Rbdomiosarcoma allo scopo di individuare i meccanismi che portano a una sua deregolazione. Il programma di lavoro focalizzerà l'attenzione sul complesso di rimodellamento della cromatina SWI/SNF e sui pathways da esso regolati. Questo complesso svolge nelle cellule un ruolo opposto a quello del complesso PRC2. Infatti, mentre le proteine PcG sono frequentemente sovraespresse nei tumori, le subunità del complesso SWI/SNF sono spesso inattivate. A tale scopo saranno create linee stabili di RMS in cui la funzione del complesso SWI/SNF è ripristinata. Le linee generate saranno sottoposte a saggi morfologici e all'analisi dei livelli d'espressione di markers muscolo-specifici e di EZH2 nel tentativo di individuare un'eventuale attivazione del processo differenziativo e una correlazione fra l'inattivazione del complesso SWI/SNF e la sovraespressione di EZH2 nel RMS.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

- a. Identification of "small molecules" based on the amino acid sequence of the tumor suppressor p130/pRb2 gene: Characterization of "Spa310" and derivatives, as prospective candidates for cancer therapy. – Prof. Antonio Giordano, Director of the Sbarro Institute for Cancer Research and Molecular Medicine, College of Science & Technology, Temple University Philadelphia (USA)
- b. Role of DNA Repair in Genomic and Epigenomic Stability. – Prof. Alfonso Bellacosa – Cancer Biology Program, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia (USA)
- c. Role of viral infection during the tumor progression. – Prof. Antonio Giordano, Director of Sbarro Institute for Cancer Research and Molecular Medicine, College of Science & Technology, Temple University Philadelphia (USA)

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

Cappe a flusso laminare, incubatori a CO₂, microscopio ottico invertito, microscopio confocale, Real-Time PCR, Citofluorimetro.

PAROLE CHIAVE

Cell cycle, Epigenetics, Cancer, Myogenesis, PRC complex.

UNITA' DI RICERCA INBB
Parma

RESPONSABILE SCIENTIFICO

BETTATI STEFANO

LINEA DI RICERCA

Biofisica e Fisica Medica di sistemi complessi

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Bettati Stefano	PO	stefano.bettati@unipr.it
Pedrazzi Giuseppe	PA	giuseppe.pedrazzi@unipr.it
Croci Simonetta	RU	simonetta.croci@unipr.it
Bruni Luca	DR	luca.bruni@nemo.unipr.it
Vaccari Silvia	PT	vaccari.silvia@unipr.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Unità di Biofisica e Fisica Medica, Dipartimento di Neuroscienze, Università degli Studi di Parma

Indirizzo Via Volturno 39

Telefono 0521 905502 (responsabile scientifico)

E-mail stefano.bettati@unipr.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Milano

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

- 1) Studio effetti antiproliferativi e citostatici della soluzione acquosa di D-Ribosio e Bicarbonato di Potassio (K:D-Rib) su linee cellulari di carcinoma mammario umano (HTB 126) e linea cellulare metastatica (HT30); studio di eventuali effetti anche sulla linea di cellule epiteliali non tumorali HTB125.
- 2) Studio delle concentrazioni di K⁺ extra/intra cellulare tramite DNAzima.
- 3) Meccanismi di regolazione allosterica di enzimi dipendenti dalla vitamina B6 come cofattore: triptofano sintasi e O-acetilserina sulfidrilasi.
- 4) Processo di folding-unfolding, dinamiche e pathways di protonazione della green fluorescent protein in soluzione, che in gel nanoporosi di silice e in cristalli singoli di proteina.
- 5) Caratterizzazione strutturale e funzionale di proteine trasportatrici di ossigeno in soluzione, in cristallo e incapsulate in gel di silice, anche in funzione della progettazione e sviluppo di "blood substitutes".

Risultati ottenuti

- 1) Il K:D-Rib sulla linea HTB-126 ha mostrato un effetto citostatico; effetti ne citostatici ne citotossici sono stati evidenziati sulla linea non tumorale HTB 125.
- 2) Misure di K⁺ extracellulare su cellule trattate con K:D-Rib hanno confermato la fattibilità di questa metodologia.
- 3) E' stata caratterizzata l'interazione dell'O-acetilserina sulfidrilasi con altre proteine coinvolte nella biosintesi di aminoacidi solforati, con un ruolo chiave nei meccanismi di assimilazione dello zolfo e nella sintesi di molecole ad attività antiossidativa. Sono stati progettati e testati inibitori specifici dell' O-acetilserina sulfidrilasi, base per lo sviluppo di molecole ad attività antibiotica.
- 4) E' stato caratterizzato il ruolo di singoli aminoacidi nella stabilità termodinamica e cinetica e nella fotodinamica della green fluorescent protein.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

1. Croci S, Bruni L., Bussolati S., Castaldo M., et al.,: *Potassium bicarbonate and D-ribose effects on A72 canine and HTB-126 human cancer cell line proliferation in vitro*. Cancer Cell International 2011, 11:30.
2. S. Croci, I. Ortalli. Mössbauer Absorption Spectroscopy: Bio-medical applications. La Rivista Del Nuovo Cimento della Società Italiana di Fisica, 2011 vol. 34, N.2, p. 69-101.
3. Salsi, E., Guan, R., Campanini, B., Bettati, S., Lin, J., Cook, P. F. and Mozzarelli, A. Exploring O-acetylserine sulfhydrylase-B isoenzyme from *Salmonella typhimurium* by fluorescence spectroscopy. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 505, 178-185 (2011).
4. Ronda, L., Bruno, S., Bettati, S. and Mozzarelli, A. Protein crystal microspectrophotometry. *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics* 1814, 734-741 (2011).

5. Bettati, S., Pasqualetto, E., Lolli, G., Campanini, B. and Battistutta, R. Structure and single crystal spectroscopy of Green Fluorescent Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*, 1814, 824-833 (2011).
6. Bosisio, C., Quercioli, V., Chirico, G., D'Alfonso, L., Bettati, S., Raboni, S., Campanini, B. and Collini, M. Effect of the point mutation H148G on GFPmut2 unfolding kinetics by fluorescence spectroscopy. *Biophysical Chemistry*, 157, 24-32 (2011).
7. Bettati, S., Luque, F. J. and Viappiani, C. *Protein dynamics: Experimental and computational approaches*. *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*, 1814, 913-915 (2011).
8. Mozzarelli, A., Bettati, S., Campanini, B., Salsi, E., Raboni, S., Singh, R., Spyraakis, F., Kumar, V. P. and Cook, P. F. The multifaceted pyridoxal 5'-phosphate-dependent *O*-acetylserine sulfhydrylase. *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*, 1814, 1497–1510 (2011).
9. Bruno, S., Ronda, L., Abbruzzetti, S., Viappiani, C., Bettati, S., Sanjoy Kumar Maji, S. and Mozzarelli, A. *Protein Encapsulation, Conformations and Nanobiotoools*. In *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, Nalwa, H. S., Ed., American Scientific Publishers, CA, USA, 2011, Vol. 21, pp. 481-517*.
10. Mozzarelli, A. and Bettati, S. *Chemistry and biochemistry of oxygen therapeutics: from transfusion to artificial blood*. *John Wiley and Sons Ltd., Chichester, UK, 2011*.
11. Bettati S. and Mozzarelli, A. Hemoglobin reactivity and regulation. In *Chemistry and biochemistry of oxygen therapeutics: from transfusion to artificial blood*, Mozzarelli, A. and Bettati, S., Eds. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, UK, 2011, pp. 11-19.
12. A. Filabozzi, A. Deriu, M.T. Di Bari, D. Russo, S. Croci, A. Di Venere. Elastic incoherent neutron scattering as a probe of high pressure induced changes in protein flexibility. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins And Proteomics*, 2010 vol. 1804, p. 63-67.
13. Salsi, E., Bayden, A. S., Spyraakis, F., Amadasi, A., Campanini, B., Bettati, S., Dodatko, T., Cozzini, P., Kellogg, G. E., Cook, P. F., Roderick, S. L. and Mozzarelli, A. Design of *O*-acetylserine sulfhydrylase inhibitors by mimicking nature. *Journal of Medicinal Chemistry* 53, 345-356 (2010).
14. Quercioli, V., Bosisio, C., Daglio, S., Rocca, F., D'Alfonso, L., Collini, M., Baldini, G., Chirico, G., Bettati, S., Raboni, S. and Campanini, B. Photo-induced millisecond switching kinetics in the GFP MUT2 E222Q mutant. *Journal of Physical Chemistry B* 114, 4664-4677 (2010).
15. Salsi, E., Campanini, B., Bettati, S., Raboni, S., Roderick, S. L., Cook, P. F. and Mozzarelli, A. A two-step process controls the formation of the hienzyme Cysteine Synthase complex. *Journal of Biological Chemistry* 285, 12813-12822 (2010).
16. Mozzarelli, A., Ronda, L., Faggiano, S., Bettati, S. and Bruno, S. Haemoglobin-based oxygen carriers: research and reality towards an alternative to blood transfusions. *Blood Transfusion* 8, Suppl. 3, s59-s68 (2010).
17. Tian, H., Guan, R., Salsi, E., Campanini, B., Bettati, S., Kumar, V. P., Karsten, W. E., Mozzarelli, A. and Cook, P. F. Identification of the structural determinants for the stability of substrate and aminoacrylate external Schiff bases in *O*-acetylserine sulfhydrylase-A. *Biochemistry* 49, 6093-6103 (2010).
18. Raboni, S., Contestabile, R., Spyraakis, F., Campanini, B., Amadasi, A., Bettati, S., Peracchi, A. and Mozzarelli, A. Pyridoxal 5'-Phosphate-Dependent Enzymes: Catalysis, Conformation and Genomics. In *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biochemistry*, Mander, L. and Lui, H.-W., Eds., Elsevier, Oxford, UK, 2010, Vol. 7, pp. 273-350.
19. Bruno, S., Ronda, L., Faggiano, S., Bettati, S. and Mozzarelli, A. Oxygen Delivery via Allosteric Effectors of Hemoglobin and Blood Substitutes. In *Burger's Medicinal Chemistry, Drug Discovery and Development*, Abraham, D. J. and Rotella, D. P., Eds., John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2010, Vol. 4, pp. 609-659.

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

- 1) Nello studio degli effetti del K:D-Rib si valuterà:
 - la migrazione e motilità delle linee cellulari tumorali HTB-126 ed HTB-30 tramite *wound healing assay*;
 - l'effetto protettivo del K:D-Rib irraggiando con dosi da 2Gy di raggi-X la linea cellulare HTB-125 trattata in precedenza con K:D-Rib. I danni da radiazioni saranno rilevati con *COMET assay*.
 - la concentrazione di K⁺ oltre che extracellulare anche intracellulare tramite DNAzima, valutando inoltre l'effetto del K⁺ sulla stabilizzazione dei G-quadruplex genomici.
- 3) Si proseguirà lo studio dell'interazione tra *O*-acetilserina sulfidrilasi e inibitori via via più specifici ed efficaci, mirando allo sviluppo di molecole ad attività antibiotica.
- 4) Lo studio delle proprietà funzionali dell'emoglobina in gel nanoporosi di silice continuerà allo scopo di perfezionare la comprensione dei meccanismi di regolazione allosterica e di validare i diversi modelli funzionali. Verranno inoltre studiati gli effetti di piccole molecole in grado di perturbare selettivamente una o più delle proprietà funzionali dell'emoglobina (affinità per l'ossigeno, velocità di autoossidazione, reattività col monossido di azoto) per migliorare le caratteristiche terapeutiche di sostituti del sangue a base emoglobinica.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

- 1) Dr. William A. Eaton, Laboratory of Chemical Physics, Building 5, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892-0520, USA.
- 2) Prof. Paul F. Cook, Department of Chemistry and Biochemistry, University of Oklahoma, Norman, Oklahoma 73019, USA.

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

- a) tre spettroscopi Mössbauer dotati di criostati capaci di lavorare fra 1000 K e 2 K, con la possibilità di raffreddare una sorgente fino a LNT
- b) spettrometro EPR in banda X (9.5 GHz) e in banda Q (35 GHz), con cavità a temperature variabile da RT a LHeT
- c) spettrofluorimetro a modulazione e correlazione di fase per misure di spettri di emissione steady-state, di polarizzazione della luminescenza, di tempi di vita di luminescenza e di decadimenti di anisotropia
- d) microscopio ottico invertito con *time lapse*
- e) cabina per irraggiamenti X

PAROLE CHIAVE

Proteine, Patologie degenerative, Spettroscopia, Fluorescenza, Mössbauer.

UNITA' DI RICERCA INBB
Roma

RESPONSABILE SCIENTIFICO

CUTRUZZOLÀ FRANCESCA

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Cutruzzolà Francesca PO Francesca.cutruzzola@uniroma1.it

Non Aderenti INBB

Rinaldo Serena	RU	Serena.rinaldo@uniroma1.it
Giardina Giorgio	BC	Giorgio.giardina@uniroma1.it
Franceschini Stefano	BC	Stefano.franceschini@uniroma1.it
Stelitano Valentina	DR	Valentina.stelitano@uniroma1.it
Caruso Manuela	A	Manuela.caruso@uniroma1.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Indirizzo Dipartimento di Scienze Biochimiche- Sapienza Università di Roma-P.le A.Moro 5-00185 Roma

Telefono 0649910955-0649910713

Fax 064440062

E-mail francesca.cutruzzola@uniroma1.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Roma

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

L'attività scientifica del gruppo e' rivolta alle tematiche della Biologia Molecolare e della Biochimica, con particolare riferimento ai meccanismi molecolari della regolazione biologica. Le tematiche scientifiche sono state affrontate con un approccio integrato di ingegneria proteica, analisi cinetiche in soluzione e biocristallografia. Le linee di ricerca attive negli anni più recenti riguardano da un lato gli aspetti molecolari delle infezioni batteriche croniche con particolare attenzione al metabolismo dell'ossido nitrico (NO) ed al ruolo del secondo messaggero diGMP-ciclico nella formazione di biofilm da parte di batteri patogeni. Nel gruppo della prof. Cutruzzolà vengono anche proseguiti gli studi sui meccanismi molecolari della reattività in proteine, soprattutto quelle contenenti cofattori quali eme e PLP, che vengono studiate per comprenderne il funzionamento e/o il coinvolgimento in patologie anche neurodegenerative.

Risultati ottenuti

I principali risultati sono stati ottenuti integrando studi strutturali, funzionali ed in vivo su (i) enzimi coinvolti nella biosintesi di NO; (ii) sensori trascrizionali dell'NO ed (iii) enzimi coinvolti nella sintesi e degradazione del di-GMP-ciclico. In quest'ultimo campo vengono studiati potenziali inibitori del metabolismo del c-di-GMP, composti potenzialmente molto interessanti per elaborare nuove strategie anti-biofilm, a tutt'oggi non disponibili. Nell'ambito degli studi di reattività particolarmente rilevante è il recente risultato sul meccanismo di attivazione della DOPA decarbossilasi umana, enzima chiave nella sintesi di neurotrasmettitori quali dopamina e serotonina, che apre nuove prospettive per la cura di alcune patologie neurodegenerative (Parkinson).

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

1. Chi, C., Haq, S., Rinaldo, S., Dogan, J., Cutruzzolà, F., Engström, Å., Gianni, S., Lundström, P., Jemth, P., (2012) Interactions outside the boundaries of the canonical binding groove of a PDZ domain influence ligand binding. *Biochemistry*, in press.
2. Rinaldo S., Castiglione N., Giardina G., Caruso M., Arcovito A., Della Longa S., D'Angelo P., Cutruzzolà F. (2012) Unusual heme binding properties of the Dissimilative Nitrate respiration Regulator (DNR), a bacterial nitric oxide sensor. *Antioxid Redox Signal.* 17:1178-1189
3. Castiglione N., Rinaldo S., Giardina G., Stelitano V., Cutruzzolà F. (2012) Nitrite and Nitrite Reductases: From Molecular Mechanisms to Significance in Human Health and Disease. *Antioxid Redox Signal.* 17:684-716
4. Giardina G., Montioli R., Gianni S., Cellini, B., Paiardini, A., Borri Voltattorni, C., Cutruzzolà F. (2011) The open conformation of human DOPA decarboxylase reveals the mechanism of PLP addition to Group II decarboxylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 20514-20519.
5. Daidone, F., Florio, R., Rinaldo, S., Contestabile, R., di Salvo, M.L., Cutruzzolà, F., Bossa, F., Paiardini, A. (2011) In silico and in vitro validation of serine hydroxymethyltransferase as a chemotherapeutic target of the antifolate drug pemetrexed. *Eur J Med Chem.* 46,1616-21.

6. Castiglione N, Stelitano V, Rinaldo S, Giardina G, Caruso M, Cutruzzolà F. Metabolism of cyclic-di-GMP in bacterial biofilms: From a general overview to biotechnological applications. *Indian J Biotechnol.* 10, 423-431. (affiliazione INBB)
7. Radoul, M., Bykov, D., Rinaldo, S., Cutruzzolà, F., Neese, F., Goldfarb, D. (2011) Dynamic hydrogen bonding network in the distal pocket of the nitrosyl complex of *Pseudomonas aeruginosa* cd1 nitrite reductase. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 3043-55..
8. Rinaldo, S., Sam, K.A., Castiglione, N., Stelitano, V., Arcovito, A. Brunori, M., Allen, J.A, Ferguson, S.J., Cutruzzolà, F. (2011) Observation of fast release of NO from ferrous d_I haem allows formulation of a unified reaction mechanism for cytochrome cd_I nitrite reductases. *Biochem.J.* 435, 217-25.
9. Rinaldo S., Giardina, G., Castiglione, N., Stelitano, V., Cutruzzolà F. (2011) The catalytic mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* cd_I Nitrite Reductase, *Biochem Soc Trans.*, 39, 195-200.
10. Giardina, G., Castiglione, N., Caruso, M., Cutruzzolà F., Rinaldo S. (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* DNR transcription factor: light and shade of nitric oxide sensing mechanism. *Biochem Soc Trans.*, 39, 294-298.

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Analisi della struttura/meccanismo di azione e ruolo biologico di proteine coinvolte nella biosintesi del secondo messaggero diguanilato ciclico (c-di-GMP) in batteri patogeni.

Analisi della struttura/meccanismo di azione e ruolo biologico di proteine coinvolte nella biosintesi dei nucleotidi in cellule procariotiche ed eucariotiche.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

Weizmann Institute of Science (IL)-University of Oxford(UK)-Biozentrum (CH).

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

Facility per espressione/purificazione di proteine ricombinanti

Robot per la cristallizzazione di proteine (Phoenix-Art Robbins)

Strumentazione per la Calorimetria di Titolazione Isoterma (ITC200 GE Healthcare)

Real-time PCR.

HPLC.

PAROLE CHIAVE

ERC LS1_1 Molecular biology and interactions

ERC LS1_2 General biochemistry and metabolism

ERC LS9_1 Genetic engineering, transgenic organisms, recombinant proteins, biosensors

ERC LS6_7 Immunity and infection: microbiology

ERC LS7_3 Pharmacology, pharmacogenomics, drug discovery and design, drug therapy

UNITA' DI RICERCA INBB
Parma

RESPONSABILE SCIENTIFICO

BETTUZZI SAVERIO

LINEA DI RICERCA

Struttura, funzioni e ruolo biologico del gene clusterina (CLU);
CLU e la sua forma nucleare (nclu) come fattore oncosoppressivo nel cancro della prostata;
Studio della struttura e delle proprietà delle isoforme mrna e proteiche di CLU;
Studio della regolazione anche epigenetica dell'espressione di CLU;
Attività anti-tumorale delle catechine del tè verde;
Meccanismo d'azione delle catechine del tè verde;
Chemioprevenzione del cancro prostatico;
Gene profiling del cancro prostatico;
Identificazione e validazione di marcatori molecolari con valore diagnostico, prognostico e predittivo di risposta a terapia per il cancro della prostata;
Studio degli effetti benefici per la salute umana di metaboliti secondari e di antiossidanti di origine vegetale.

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Saverio Bettuzzi	PO	saverio.bettuzzi@unipr.it
Daniele Del Rio	RU	daniele.delrio@unipr.it
Federica Rizzi	RU	federica.rizzi@unipr.it

Non Aderenti INBB

Maria Giovanna Troglio	PT	mariagiovanna.troglio@unipr.it
Alessandro Silva	BC	
Valeria Naponelli	BC	
Martina Bonacini	BC	
Ileana Ramazzina	BC	

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Dipartimento di Scienze Biomediche Biotecnologiche e Traslazionali dell'Università di Parma
Sezione di Biochimica, Biologia Molecolare e Medicina Molecolare
Via Volturmo, 39- 43100 PARMA
Telefono 0521-903803
Fax 0521-903802
E-mail: saverio.bettuzzi@unipr.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Milano

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

Comprendere il ruolo biologico del gene Clusterina (CLU) e delle sue isoforme nel controllo della proliferazione dell'epitelio prostatico, nell'apoptosi, nel ciclo cellulare, nel differenziamento e nella cancerogenesi della prostata e di altri organi e tessuti. Dissezione molecolare dello sviluppo e della progressione del cancro della prostata. Messa a punto di nuovi approcci diagnostici e terapeutici per la malattia. Chemioprevenzione del cancro della prostata. Validazione di metodi molecolari per la diagnosi e la prognosi del cancro prostatico, nonché della risposta a terapia. Studio del meccanismo d'azione anti-tumorale delle catechine del tè verde. Identificazione e studio delle eventuali proprietà biologiche dei metaboliti delle catechine in modelli animali ed umani.

Risultati ottenuti

- 2009: dimostrazione che CLU è un onco-soppressore per il cancro della prostata e per il neuroblastoma in modelli transgenici;
- 2010: pubblicazione della monografia in due tomi "Clusterin" per Advances in Cancer Research (Casa Editrice Elsevier, USA).
- 2011: ruolo oncosoppressivo di nCLU nel cancro ovarico; le catechine del tè verde provocano stress del reticolo in cellule di cancro prostatico;
- 2012: ruolo di IL24 nella regolazione dell'espressione differenziale di nCLU e sCLU nel cancro prostatico.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012 (* con affiliazione anche al Consorzio sono evidenziate; l'Impact Factor indicato è relativo all'anno 2010)

1. "The Clusterin Paradigm in Prostate and Breast Carcinogenesis"
F. Rizzi, S. Bettuzzi
Endocr Relat Cancer 17:R1-R17, 2010 invited review.....IF 4.432
2. "Upregulation of Clusterin in Prostate and DNA Damage in Spermatozoa from Bisphenol A-Treated Rats, and Formation of DNA Adducts in Cultured Human Prostatic Cells" *
S. Bettuzzi, P. Davalli, S. A. Davoli, F. Rizzi, M. G. Troglia, A. Camoirano, F. D'Agostini, S. De Flora, A. Izzotti, S. La Maestra and R. T. Micale
Toxicol Sci. 22:45-51, 2011IF 5.093
3. "Molecular mechanisms of the anti-metastatic activity of nuclear Clusterin (nCLU) in prostate cancer cells"
R. M. Moretti, M. Montagnani Marellia, S. Maia, F. Rizzi, S. Bettuzzi and P. Limonta
International Journal of Oncology 39:225-234, 2011IF 2.571
4. "mda-7/IL-24 differentially regulates soluble and nuclear clusterin in prostate cancer"
Bhutia, Sujit; DAS, SWADESH; KEGELMAN, TIMOTHY; Azab, Belal; Dash, Rupesh; SU, Zao-zhong; Wang, Xiang-Yang; Rizzi, Federica; Bettuzzi, Saverio; LEE, SEOK-GEUN; Dent, Paul; Grant, Steven; Curiel, David; Sarkar, Devanand; Fisher, Paul.
Journal of Cellular Physiology 227: 1805-1813, 2012IF 3.986
5. Intracellular Clusterin negatively regulates ovarian chemoresistance: compromised expression sensitizes ovarian cancer cells to paclitaxel
M K. Hassan, H Watari, L K. Christenson, S. Bettuzzi, I. Shoichi and N. Sakuragi
Tumor Biology 32:1031-1047, 2011IF 2.026
6. Chronic administration of green tea extract to TRAMP mice induces the collapse of Golgi apparatus in prostate secretory cells and results in alterations of protein post-translational processing
P. Davalli, F. Rizzi, G. F. Caldara, S. Davoli, A. Corti, A. Silva, S. Astancolle, M. Vitale, S. Bettuzzi, M. Arcari and G. Azzali
Int. J. Oncol 39:1521-1527, 2011 IF 2.571
7. Health Benefits of Tea.
Serafini M, Del Rio D, Yao DN, Bettuzzi S, Peluso I.
In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press; Chapter 12, p 239-261, 2011.
8. Anticancer activity of green tea polyphenols in prostate gland
P. Davalli, F. Rizzi, A. Caporali, D. Pellacani, S. Davoli, S. Bettuzzi, M. A. Brausi and D. D'Arca
Oxidative Medicine and Cellular Longevity, in press 2012.....IF 2.468

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Definizione del ruolo biologico e del meccanismo d'azione di CLU ed nCLU nello sviluppo del cancro della prostata (PCa). Studio della struttura delle isoforme trascrizionali e proteiche di CLU. Studio del controllo dell'espressione di CLU anche per via epigenetica. Studio integrato dell'espressione di CLU e dei geni del metabolismo delle poliammine. Studio del comportamento biologico del PCa. Definizione del profilo di espressione associato a inizio, progressione e prognosi del PCa. Definizione del profilo di espressione genico associato alla risposta terapeutica ad estratti di catechine del tè verde (GTE). Studio della attività anti-tumorale di GTE e del loro meccanismo d'azione anche in altre neoplasie. Studio del metabolismo delle catechine, identificazione dei cataboliti e studio delle loro eventuali proprietà biologiche.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

Dr. Arturo Sala,

Senior Lecturer, Molecular Haematology and, Cancer Biology Unit, Institute of Child Health, 30 Guilford Street, London WC1N 1EH, UK., tel 44-020-7905-2714, fax 44-020-78138100
a.sala@ich.ucl.ac.uk

Prof. Norman J. Maitland

YCR Cancer Research Unit, Department of Biology, University of York, PO Box 373, York YO1 5YW, U.K.
njm9@york.ac.uk

Prof. Alan Crozier

Plant Products and Human Nutrition Group, Division of Environmental and Evolutionary Biology, Faculty of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow G12 8QQ, U.K.

Prof Arkadiusz Orzechowski

Department of Physiological Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw Agricultural University, Nowoursynowska 159, 02-776 Warsaw, Poland

Prof Carmen Socaciu

Department of Chemistry and Biochemistry University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Manastur 3-5, 400372 Cluj-Napoca, Romania

Dr Zama Djamilia

Laboratoire de Valorisation des Ressources Naturelles et Synthèses de Substances Biologiquement Actives, Faculté des Science Exactes, Université Mentouri, Constantine, Algérie.

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

Nucleic Acid Prep station

Real-Time qPCR

Personal Arrayer per lo spottaggio di DNA chip custom-made

HPLC interfacciato a spettrometro di massa a triplo quadrupolo (Waters Quattro Micro API)

Spettrofluorimetro LS-55 Perkin Elmer

Termociclatore per Real Time PCR modello MJ chromo4 per la rilevazione simultanea di 4 fluorofori

Ultracentrifuga Beckman Coulter Optima L-100 XP

Lettore di Piastre multimodale Enspire (Perkin Elmer) dotato di monocromatore quadruplo per lettura di fluorescenza dall'alto e dal basso, fluorescenza in tempo risolto, FRET, luminescenza, BRET, Assorbanza UV-VIS.

Microscopio a fluorescenza invertito modello Axiovert 200 (Zeiss) dotato di sistema di acquisizione di immagini integrato (fotocamera a colori ad alta risoluzione).

PAROLE CHIAVE

Clusterin; Prostate Cancer; Green Tea Catechins; Gene Expression; Bioavailability.

Settori ERC:

LS1_1

LS1_2

LS2_1

LS2_8

LS3_2

LS3_3

LS3_4

LS4_5

LS7_2

LS9_1

UNITA' DI RICERCA INBB
Genova

RESPONSABILE SCIENTIFICO:

CANESI LAURA

LINEA DI RICERCA:

Risposte degli organismi marini allo stress ambientale

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Canesi Laura PA Laura.Canesi@unige.it

Non Aderenti INBB

Gallo Gabriella PO galloga@unige.it
Fabbri Rita PT rita.fabbri@unige.it
Balbi Teresa DR teresa.balbi@unige.it
Barmo Crisitna BC cristina.barmo@unige.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA:

DiSTAV- Dipartimento di scienze della terra, dell'ambiente e della vita, Università di Genova

Indirizzo: Corso Europa 26, 16132

Telefono : +39 010 3538041

Fax : +39 010 3538267

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Genova

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

L'attività di ricerca è stata rivolta principalmente alla valutazione delle risposte fisiologiche di invertebrati marini ad agenti stressanti ambientali sia naturali (batteri potenzialmente patogeni per i bivalvi o per l'uomo) che di origine antropica (quali cromo esavalente, interferenti endocrini quali diossine e pesticidi organoclorurati, ed inquinati emergenti come le nanoparticelle), con particolare riferimento agli effetti sulla funzione immunitaria.

Risultati ottenuti

I risultati ottenuti hanno messo in luce i principali meccanismi di azione coinvolti nelle risposte biologiche di invertebrati marini, quali il mitilo, allo stress ambientale, dal livello molecolare a quello di organismo. Un aspetto di particolare interesse riguarda l'identificazione di meccanismi ed effetti comuni di vari inquinanti ambientali in cellule di invertebrati e mammiferi, che coinvolgono lo stress ossidativo, componenti dei sistemi di trasduzione del segnale degli estrogeni, processi infiammatori ed apoptotici, variazioni dell'espressione genica.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

1. **Canesi L**, Ciacci C, Vallotto D, Gallo G, Marcomini A, Pojana G, 2010. In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO₂, SiO₂) on Mytilus hemocytes. *Aquat. Toxicol.* 96:151-8.
2. **Canesi L**, Barmo C, Fabbri R, Ciacci C, Vergani L, Roch P, Gallo G, 2010. Effects of vibrio challenge on digestive gland biomarkers and antioxidant gene expression in Mytilus galloprovincialis. *Comp. Biochem. Physiol C Toxicol Pharmacol.* 152:399-406
3. **Canesi L**, Ciacci C, Vallotto D, Gallo G, Marcomini A, Pojana G, 2010. Biomarkers in Mytilus galloprovincialis exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO₂, Nano-SiO₂) *Aquat. Toxicol.* 100:168-77.
4. Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M, **Canesi L**, Papa S, Galli F, 2010. Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J.*, 24, 3603-3624
5. Ciacci C, Betti M, Canonico B, Citterio B, Roch P, **Canesi L**, 2010. Specificity of anti-Vibrio immune response through p38 MAPK and PKC activation in the hemocytes of the mussel Mytilus galloprovincialis. *J. Invert. Pathol.* 105:49-55
6. Sforzini S, Dagnino A, Oliveri L, **Canesi L**, Viarengo A, 2011. Effects of dioxin exposure in Eisenia andrei: integration of biomarker data by an Expert System to rank the development of pollutant-induced stress syndrome in earthworms. *Chemosphere.* 185:934-42.
7. Barmo C, Ciacci C, Fabbri R, Olivieri S, Bianchi N, Gallo G, **Canesi L**. 2011. Pleiotropic effects of hexavalent chromium (CrVI) in Mytilus galloprovincialis digestive gland. *Chemosphere.* 83:1087-95.

8. **Canesi L**, Negri A, Barmo C, Banni M, Gallo G, Viarengo A, Dondero F, 2011. The Organophosphate Chlorpyrifos Interferes with the Responses to 17 β -Estradiol in the Digestive Gland of the Marine Mussel *Mytilus galloprovincialis*. PLoSOne. 6(5):e19803.
9. Ciacci C, Barmo C, Fabbri R, Canonico B, Gallo G, **Canesi L**, 2011 Immunomodulation in *Mytilus galloprovincialis* by non-toxic doses of hexavalent chromium. Fish Shellfish Immunol. 31:1026-1033.
10. Ciacci C, Barmo C, Gallo G, Maisano M, Cappello T, D'Agata A, Leonzio C, Mauceri A, Fasulo S, **Canesi L**. 2012. Effects of sublethal, environmentally relevant concentrations of hexavalent chromium in the gills of *Mytilus galloprovincialis*. Aquat Toxicol. 120-121C:109-118.
11. Ciacci C, Canonico B, Bilaničovă D, Fabbri R, Cortese K, Gallo G, Marcomini A, Pojana G, **Canesi L**. 2012. Immunomodulation by Different Types of N-Oxides in the Hemocytes of the Marine Bivalve *Mytilus galloprovincialis*. PLoS One. 7(5):e36937.
12. **Canesi L**, Ciacci C, Fabbri R, Marcomini A, Pojana G, Gallo G, 2012. Bivalve molluscs as an unique target group for nanoparticle toxicity. Mar. Environ. Res. 76:16-21

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Lo sviluppo immediato della ricerca comprenderà le attività comprese nel secondo anno del progetto PRIN2009, riguardante gli effetti di nanoparticelle su invertebrati marini, e del progetto Europeo BIVALIFE, sulla risposta immunitaria dei molluschi bivalvi all'infezione con vibrioni patogeni. Parallelamente, verranno proseguiti gli studi sugli effetti di interferenti endocrini e nanoparticelle su sistemi in vitro utilizzando diversi modelli di cellule di mammifero.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

- Prof. Philippe Roch, Université de Montpellier 2, Laboratoire ECOLAG, cc 093, Montpellier, France per le attività comprese nel Progetto Europeo IMAQUANIM (Area T6.4, project n. 007103) nell'ambito del VI Programma Quadro (Research, Technology, Development and Demonstration).

- Prof. Antonio Figueras, Instituto de Investigaciones Marinas, CSIC, Vigo, Spain, per le attività comprese nel Progetto Europeo BIVALIFE " Controlling infectious diseases in oysters and mussels in Europe ". Improving European mollusc aquaculture: disease detection and management - nell'ambito del VII Programma Quadro (KBBE-2010-4)

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

Spettrofotometro Varian Cary 50e, Spettrofotofluorimetro Perkin Elmer L50b, Biorad "Chrome4" per RT-PCR quantitativa, Ultracentrifughe e supercentrifughe, microscopio Olympus.

PAROLE CHIAVE

LS3, LS4, LS6

UNITA' DI RICERCA INBB
Ancona

RESPONSABILE SCIENTIFICO
CARNEVALI OLIANA

LINEA DI RICERCA

Qualità dei gameti, ecotossicologia riproduttiva, sistemi che controllano appetito e metabolismo

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Carnevali Oliana	PO	o.carnevali@univpm.it
------------------	----	-----------------------

Non Aderenti INBB

Olivotto Ike	RU	i.olivotto@univpm.it
Maradonna Francesca	PT	f.maradonna@univpm.it
Gioacchini Giorgia	A	giorgia.gioacchini@univpm.it
Piccinetti Chiara	A	c.piccinetti@univpm.it
Falcinelli Silvia	DR	falcinelli.silvia@gmail.com

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Università Politecnica delle Marche, Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente

Indirizzo Via Brece Bianche 60131 Ancona

Telefono 071-2204990

Fax 071-2204650

E-mail o.carnevali@univpm.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Roma

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI (max. 2000 caratteri tra obiettivi e risultati)

Obiettivi e Risultati ottenuti

Tossicologia- Gli inquinanti presenti nell'ambiente possono influenzare l'endocrinologia degli organismi acquatici, sia marini che d'acqua dolce. Gli inquinanti classificati come distruttori endocrini, possono interferire con la biologia riproduttiva ma anche con altre funzioni di vitale importanza quali lo stimolo dell'appetito e l'omeostasi energetica.

A tale riguardo, negli ultimi anni, si è focalizzata l'attenzione su un inquinante ubiquitario come il Di-etil-esil-ftalato (DEHP), sostanza comunemente utilizzata per la produzione di materie plastiche. E' stato innanzitutto messo in evidenza che il DEHP è in grado di modulare l'espressione di geni chiave coinvolti nella riproduzione di zebrafish portando ad una minore fecondità.

E' stato inoltre verificato che il DEHP è in grado di interferire anche con la regolazione dell'espressione i geni codificanti per molecole coinvolte nella regolazione del metabolismo inclusi geni coinvolti nello stimolo dell'appetito (NPY, CB1, LPT, GHRL), nonché del metabolismo lipidico (LPT, SREBP, CB1). I dati ottenuti evidenziano una significativa diminuzione della fame associata ad un incremento nella sintesi degli acidi grassi ad indicare l'effetto obeso genico di questo inquinante.

In collaborazione con altre unità di ricerca afferenti all'INBB, sono attualmente in corso studi sull'effetto di diverse dosi di inquinanti ambientali (NP, OCT e BPA) sulla riproduzione e sull'appetito di un teleosteo di grande interesse commerciale, l'orata. Lo studio verrà condotto mediante l'uso di biomarker molecolari (VTG, ER, LPT CB1, NPY), dosaggi ormonali e analisi morfologiche.

Miglioramento del benessere degli animali-Parallelamente agli effetti degli inquinanti ambientali, questa UDR si sta occupando dell'effetto di additivi alimentari quali i probiotici o la variazione delle condizioni ambientali sulla riproduzione e sul metabolismo usando come modello sperimentale *D. rerio*.

Numerosi dati indicano come l'introduzione di batteri benefici nell'alimentazione sia in grado di migliorare il benessere degli animali.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012 (pubblicazioni con affiliazione anche al Consorzio*)

1. LOMBARDO F, GIORGINI E, GIOACCHINI G, MARADONNA F, FERRARIS P, CARNEVALI O. (2012) Melatonin effects on *Fundulus heteroclitus* reproduction. *Reproduction, Fertility and Development* 24(6):794-803.
2. RIBECCO C., HARDIMAN G., SASIK R, VITTORI S, CARNEVALI O. (2012) Teleost fish (*Solea solea*): A novel model for ecotoxicological assay of contaminated sediments. *Aquatic Toxicology* 109:133-142.

3. GIOACCHINI, G, GIORGINI, E., MERRIFIELD D L, HARDIMAN G, BORINI A, VACCARI, L; CARNEVALI, O (2012) Probiotics can induce follicle maturational competence: the *Danio rerio* case. *Biology of Reproduction*. 8;86(3):65
4. RIBETTO C., BAKER M. E., SASIK R, ZUO Y, HARDIMAN G., CARNEVALI O. (2011) Biological effects of marine contaminated sediments on *Sparus aurata* juveniles *AQUATIC TOXICOLOGY* 104 (3-4)308-316 DOI: 10.1016/j.aquatox.2011.05.005
5. CARNEVALI O, GIOACCHINI G, MARADONNA F, OLIVOTTO I AND MIGLIARINI B. (2011) Melatonin induces follicle maturation in *Danio rerio*. *PLoS ONE* 6(5): e19978.doi:10.1371/journal.pone.0019978
6. DIMITROGLOU A., MERRIFIELD D.L., CARNEVALI O., PICCHIETTI S., AVELLA M., DANIELS C., GÜROY D., DAVIES S.J. (2011) Microbial manipulations to improve fish health and production--a Mediterranean perspective. *Fish Shellfish Immunol.* 30(1),1-16.
7. MIGLIARINI B., PICCINETTI C.C. , MARTELLA A., MARADONNA F. , GIOACCHINI G., CARNEVALI O.(2011). Perspectives on endocrine disruptor effects on metabolic sensors. *Gen. Comp. Endocrinol.* 170, 416–423. (*)
8. GIOACCHINI G., MARADONNA F., LOMBARDO F., BIZZARO D., OLIVOTTO I., CARNEVALI O. (2010) Increase of fecundity by Probiotic administration in zebrafish (*Danio rerio*). *Reproduction* 140, 953–959.
9. PICCINETTI C.C., MIGLIARINI B., OLIVOTTO I., COLETTI G., AMICI A., CARNEVALI O. (2010) Appetite regulation: the central role of melatonin in *Danio rerio*. *HORM. BEHAV.* 58 (5), 780-785. (*)
10. CARNEVALI O., TOSTI L , SPECIALE C, PENG C, ZHU Y., MARADONNA F. (2010) DEHP impairs zebrafish reproduction by affecting critical factors in oogenesis *PLOS one.* 5 (4),1-6. (*)
11. AVELLA M.A., OLIVOTTO I., SILVI S., PLACE A.R., CARNEVALI O. (2010) Effect of dietary probiotics on clownfish: a molecular approach to define how lactic acid bacteria modulate development in a marine fish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 298(2),359-371.
12. PICCINETTI C.C., MIGLIARINI B., PETROSINO S., DI MARZO V., CARNEVALI O. (2010) Anandamide and AM251, via water, modulate food intake at central and peripheral level in fish. *Gen.Comp. Endocrinol.* 166(2),259-67. (*)

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Il gruppo della professoressa Carnevali si propone di approfondire gli effetti dei distruttori endocrini sulla riproduzione e sul metabolismo focalizzando l'attenzione sui plasticizzanti come ftalati, BPA etc. Si intende analizzare i pathways che controllano l'appetito per comprendere se la presenza di tali sostanze nell'ambiente possa essere responsabile dei sempre più diffusi disordini alimentari. Si proseguirà con lo studio dell'interferenza delle suddette sostanze con la fecondità. I modelli sperimentali dello studio saranno l'orata e lo zebrafish. Per la valutazione degli effetti saranno utilizzate tecniche di genomica e di proteomica.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

Daniel Merrifield BSc PhD

Research Scientist

The University of Plymouth

A403 Portland Square

Drake Circus

Plymouth

UK

Prof. Gary Hardiman

Director BIOGEM

(BioMedical Genomics Microarray Facility)

Associate Professor

Department of Medicine

University of California San Diego

USA

Dr. Juan F. Asturiano

Prof. Titular de Universidad. Departamento de Ciencia Animal.

Grupo de Acuicultura y Biodiversidad. Instituto de Ciencia y Tecnología Animal (Edificio 7G).

Universitat Politècnica de València

46022 Valencia (Spain)

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

Spettrofluorimetro, sistema HPLC munito di detector UV/VIS e rilevatore fluorimetrico, termociclatori, Real Time PCR, microscopi ad epifluorescenza, analizzatore di immagine, polarografi, GEL Doc

PAROLE CHIAVE

Tossicologia riproduttiva , qualità dei gameti, fecondità , appetito, interferenti endocrini

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

RESPONSABILE SCIENTIFICO

CASADIO RITA

LINEA DI RICERCA

Sviluppo di tools per problem solving in Biologia Moderna

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Casadio Rita PO * casadio@biocomp.unibo.it

Non Aderenti INBB

Martelli Pier Luigi	RU *	gigi@biocomp.unibo.it
Fariselli Piero	RU *	piero@biocomp.unibo.it
Castrense Savojardo	DR *	savojard@biocomp.unibo.it
Piovesan Damiano	DR *	piovesan@biocomp.unibo.it
Profitti Giuseppe	DR *	profgiuseppe@gmail.com
Indio Valentina	DR *	valentina@biocomp.unibo.it
Tasco Gianluca	BC *	gluca@biocomp.unibo.it
Rossi Ivan	A	ivan@biodec.com
Eusebi Alberto	A	alberto@biodec.com

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Indirizzo Via San Giacomo 9/2 – 40126 Bologna

Telefono 051 - 2094005

Fax 051 - 2094005

E-mail casadio@biocomp.unibo.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Bologna

RIASSUNTO DELL' ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

Il nostro gruppo di ricerca sviluppa soluzioni computazionali a problemi di rilevanza nell'era genomica e post-genomica occupandosi principalmente della annotazione strutturale e funzionale di geni e proteine e della loro interazione. Inoltre una linea di ricerca specifica è dedicata a stabilire la relazione tra mutazioni e malattie nel genoma umano.

Risultati ottenuti

I principali risultati ottenuti elencano: una banca dati per l'annotazione funzionale e strutturale di proteomi (BAR+), lo sviluppo ed implementazione di predittori per l'annotazioni di varianti e la loro applicazione per il riconoscimento di marcatori molecolari di rare forme di cancro(vedi elenco delle pubblicazioni sotto riportato; per l'elenco completo delle pubblicazioni del periodo in questione vedi www.biocomp.unibo.it/publications.html)

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012 ((* affiliazione anche al Consorzio)

1. Martelli PL, Fariselli P, Balzani E, Casadio R -Predicting cancer-associated germline variations in proteins- BMC Genomics Jun 18;13 Suppl 4:S8 (2012) (*)
2. Vaccarelli G, Antonacci R, Tasco G, Yang F, El Ashmaoui HM, Hassanane MS, Massari S, Casadio R, Ciccarese S. Generation of diversity by somatic mutation in the Camelus dromedarius T-cell receptor gamma (TCRG) variable domains - Eur J Immunol (2012, in press) (*)
3. Martelli PL, Fariselli P, Balzani E, Casadio R -Predicting cancer-associated germline variations in proteins- BMC Genomics Jun 18;13 Suppl 4:S8 (2012) (*)
4. Squerzanti M, Cervellati C, Ura B, Mischiati C, Pucci P, Annunziata S, Iannone C, Casadio R, Bergamini CM, Esposito C -The side chain of glutamine 13 is the acyl-donor amino acid modified by type 2 transglutaminase in subunit T of the native rabbit skeletal muscle troponin complex- Amino Acids (2011, in press) (*)
5. Pantaleo MA, Nannini M, Astolfi A, Biasco G; GIST Study Group Bologna -A distinct pediatric-type gastrointestinal stromal tumor in adults: potential role of succinate dehydrogenase subunit A mutations- Am J Surg Pathol 35:1750-1752 (2011) (*)
6. Savojardo C, Fariselli P, Casadio R -Improving the detection of transmembrane beta-barrel chains with N-to-1 extreme learning machines- Bioinformatics 27:3123-3128 (2011) (*)
7. Casadio R, Vassura M, Tiwari S, Fariselli P, Martelli PL -Correlating disease related mutations to their effect on protein stability: a large scale analysis of the human proteome- Hum Mutat 32:1161-1170 (2011) (*)

8. Savojardo C, Fariselli P, Alhamdoosh M, Martelli PL, Pierleoni A, Casadio R-Improving the prediction of disulfide bonds in Eukaryotes with machine learning methods and protein subcellular localization- *Bioinformatics* 27:2224-2230 (2011) (*)
9. Piovesan D, Luigi Martelli P, Fariselli P, Zauli A, Rossi I, Casadio R -BAR-PLUS: the Bologna Annotation Resource Plus for functional and structural annotation of protein sequences- *Nucleic Acids Res* 39:W197-W202 (2011) (*)
10. Pierleoni A, Indio V, Savojardo C, Fariselli P, Martelli PL, Casadio R -MemPype: a pipeline for the annotation of eukaryotic membrane proteins- *Nucleic Acids Res* 39:W375-W380 (2011) (*)
11. Pantaleo MA, Astolfi A, Indio V, Moore R, Thiessen N, Heinrich MC, Gnocchi C, Santini D, Catena F, Formica S, Martelli PL, Casadio R, Pession A, Biasco G -SDHA Loss-of-Function Mutations in KIT-PDGFR α Wild-Type Gastrointestinal Stromal Tumors Identified by Massively Parallel Sequencing- *J Natl Cancer Inst* 103:983-987 (2011) (*)
12. Pierleoni A, Martelli PL, Casadio R -MemLoc: predicting subcellular localization of membrane proteins in Eukaryotes- *Bioinformatics* 27:1224-1230 (2011) (*)

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Sviluppo di tools e piattaforme integrate per l'analisi di dati derivanti da sequenziatori di ultimissima generazione. Il gruppo ha di recente acquisito un ION TORRENT (vedi Genome Biology Group: www.biocomp.unibo.it/centregenomebio) per varie applicazioni di genetica animale e medica.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

1. RGB-Net: a Collaborative European Network on Rabbit Genome Biology (<http://www.biocomp.unibo.it/rabbit/>)
2. Prof. David Jones - University College London, Department of Computer Science (<http://www0.cs.ucl.ac.uk/staff/d.jones/>)
3. Prof. Hongbin Shen - Department of Automation, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai (http://www.csbio.sjtu.edu.cn/index_Eng.htm)

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

- i) Cluster high performance: 5 dual Xeon core2 servers, per un totale di 28 processori e 15 TB di capacità di data storage;
- ii) Cluster di 2 servers dual Opteron dual core e 6 server dual xeon;
- iii) 2 File servers;
- iv) 8 Linux workstation.

PAROLE CHIAVE

LS2_13 Bioinformatics

LS2_14 Computational biology

LS2_16 Systems biology

LS2_9 Proteomics

LS2_8 Genomics, comparative genomics, functional genomics

UNITA' DI RICERCA INBB
Firenze

RESPONSABILE SCIENTIFICO

CHITI FABRIZIO

LINEA DI RICERCA

Biomolecole

TITOLO

Studio dei meccanismi di aggregazione di proteine

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Chiti Fabrizio	PA	fabrizio.chiti@unifi.it
----------------	----	-------------------------

Non Aderenti INBB

Bemporad Francesco	RU	francesco.bemporad@unifi.it
Filoni Camilla	BC	camilla.filoni@unifi.it
Cascella Roberta	BC	roberta.cascella@unifi.it
Mannini Benedetta	DR	benedetta.mannini@unifi.it
Claudia Capitini	BC	claudia-capitini@hotmail.it
Maryam Monsef Shokri	A	monsef@ibb.ut.ac.ir

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Univerisità degli Studi di Firenze, Dipartimento di Scienze Biochimiche

Viale Morgagni 50, 50134 Firenze

Telefono +39-055-4598319

Fax +39-055-4598905

E-mail fabrizio.chiti@unifi.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Bologna

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

Il principale obiettivo è stato lo studio del processo con cui proteine formano, a partire dal loro stato nativo, aggregati fibrillari ben definiti, caratterizzati da una struttura a foglietto β e capaci di legare coloranti specifici (note come fibrille amiloidi). Questo processo è alla base di numerose malattie umane. Questa unità ha cercato di investigare i meccanismi di aggregazione proteica, con particolare attenzione ai fattori di sequenza e di struttura tridimensionale che determinano la propensione di una proteina ad aggregare, a partire sia da stati destrutturati che strutturati. Si è posta inoltre l'obiettivo di studiare i determinanti strutturali della tossicità di aggregati proteici aberranti.

Risultati ottenuti

In questo triennio (2010-2012) sono stati determinati 3 principali fattori responsabili della tossicità di aggregati proteici misfoldati, ovvero la loro idrofobicità esposta, la loro piccola dimensione e il contenuto del ganglioside GM1 presente sulla membrana. È stato anche osservato come chaperoni molecolari sopprimono con alta efficienza la tossicità di tali aggregati.

Si sono inoltre studiati come le mutazioni alterano il processo di aggregazione proteica *in vivo*, identificandone i fattori chimico-fisici coinvolti.

In altri studi si è inoltre caratterizzato il processo di aggregazione proteica indotto da glicosaminoglicani utilizzando un apparecchiatura *stopped-flow* innovativa, tracciando il processo con dettagli molecolare. In un progetto correlato, si è studiato l'effetto dei glicosaminoglicani sulla tossicità degli oligomeri proteici.

Infine abbiamo continuato a studiare il processo di aggregazione cosiddetto native-like, utilizzando le acilfosfatasi di *S. solfataricus* e *D. melanogaster* come proteine modello.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

1. Campioni S, Mannini B, Zampagni M, Pensalfini A, Parrini C, Evangelisti E, Relini A, Stefani M, Dobson CM, Cecchi C, Chiti F. (2010). A causative link between the structure of aberrant protein oligomers and their toxicity. *Nature Chem. Biol.* 6, 140-147.
2. Pagano K, Bemporad F, Fogolari F, Esposito G, Viglino P, Chiti F, Corazza A. (2010). Structural and dynamics characteristics of Acylphosphatase from *Sulfolobus solfataricus* in the monomeric state and in the initial native-like aggregates. *J. Biol. Chem.* 285, 14689-14700.

3. Winkelmann J, Calloni G, Campioni S, Mannini B, Taddei N, Chiti F. (2010). Low-Level Expression of a Folding-Incompetent Protein in Escherichia coli: Search for the Molecular Determinants of Protein Aggregation In Vivo. *J. Mol. Biol.* **398**, 600-613.
4. Belli M, Ramazzotti M, Chiti F. (2011). Prediction of amyloid aggregation in vivo. *EMBO Rep.* **12**, 657-663.
5. Monsellier E, Ramazzotti M, Taddei N, Chiti F. (2010). A computational approach for identifying the chemical factors involved in the glycosaminoglycans-mediated acceleration of amyloid fibril formation. *PLoS One* **5**, e11363.
6. De Simone A, Dhulesia A, Soldi G, Vendruscolo M, Hsu STD, Chiti F, Dobson CM (2011). Experimental Energy Surfaces Reveal the Mechanisms of Maintenance of Protein Solubility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 21057-21062.
7. Saridaki T, Zampagni M, Mannini B, Evangelisti E, Taddei N, Cecchi C, Chiti F (2012). Glycosaminoglycans (GAGs) Suppress the Toxicity of HypF-N Prefibrillar Aggregates. *J. Mol. Biol.* in press.
8. Evangelisti E, Cecchi C, Cascella R, Sgromo C, Becatti M, Dobson CM, Chiti F, Stefani M (2012). Membrane lipid composition and its physicochemical properties define cell vulnerability to aberrant protein oligomers. *J. Cell. Sci.* **125**, 2416-2427.
9. Motamedi-Shad N, Garfagnini T, Penco A, Relini A, Fogolari F, Corazza A, Esposito G, Bemporad F, Chiti F (2012) Rapid oligomer formation of human muscle acylphosphatase induced by heparan sulfate. *Nature Struct. Mol. Biol.* **19**, 547-554.
10. Bemporad F, Chiti F (2012). Protein misfolded oligomers: experimental approaches, mechanism of formation, and structure-toxicity relationships. *Chem. Biol.* **19**, 315-327.
11. Bemporad F, De Simone A, Chiti F, Dobson CM. (2012). Characterizing intermolecular interactions that initiate native-like protein aggregation. *Biophys. J.* **102**, 2595-2604.
12. Mannini B, Cascella R, Zampagni R, van Waarde-Verhagen MAWH, Meehan S, Roodveldt C, Campioni S, Boninsegna M, Penco A, Relini A, Kampinga HH, Dobson CM, Wilson MR, Cecchi C, Chiti F (2012) Molecular mechanisms used by chaperones to reduce the toxicity of aberrant protein oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 12479-12484.

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

1. Identificare i determinanti del processo di aggregazione a partire da proteine globulari
2. Studiare i meccanismi di aggregazione da stati denaturati e parzialmente strutturati.
3. Studiare il rapporto tra il meccanismo di aggregazione e la struttura amiloidegenica iniziale di una proteina denaturata
4. Studiare la struttura di oligomeri prefibrillari.
5. Studiare i fattori che determinano la tossicità di aggregati proteici

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

4. Prof. Christopher M. Dobson e Dr Michele Vendruscolo (University of Cambridge, UK)
5. Joel Buxbaum and Jeff Kelly (The Scripps Research Institute, California)
6. Mark Wilson (University of Wollongong, Australia)

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

1. Spettropolarimetro per dicroismo circolare Jasco J-810 (Tokyo, Japan) equipaggiato con strumento a flusso interrotto Bio-logic SFM-20 (Claix, France)
2. Spettrofotometro "Fourier transform Infra-red" Jasco FT/IR 4200 (Tokyo, Japan)
3. Strumento a flusso interrotto Bio-logic SFM-3 accoppiato a sistemi di rilevamento di assorbimento ottico e fluorescenza (Claix, France)
4. Strumento di light scattering dinamico e statico, Zetasizer Nano S da Malvern Instruments (Malvern, Worcestershire, UK)
5. Fluorimetro PerkinElmer LS 55 fluorimeter (Wellesley, Massachusetts, USA)
6. Accesso privilegiato alle EMBL core facilities (in qualità di membro dell'EMBO Young Investigator Programme) comprendenti microscopia elettronica, produzione di anticorpi monoclonali, etc.

PAROLE CHIAVE

1. Misfolding
2. Aggregazione
3. Amiloide
4. Malattie neurodegenerative
5. Glicosaminoglicani

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

RESPONSABILE SCIENTIFICO

CONTESTABILE ANTONIO

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Antonio Contestabile *PO* antonio.contestabile@unibo.it

Non Aderenti INBB

Barbara Monti *RU* b.monti@unibo.it

Elisabetta Polazzi *BC* Elisabetta.polazzi2@unibo.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Via Selmi 3

Telefono 051 2094134

E-mail antonio.contestabile@unibo.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Bologna

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

Studiare le interazioni neuroprotettive fra microglia e neuroni identificando molecole neuroprotettive prodotte e rilasciate dalla microglia utilizzando la metodologia dell'uso di terreno condizionato dalla microglia per proteggere neuroni primari in coltura da stimoli neurotossici.

Risultati ottenuti

I più recenti risultati hanno portato alla identificazione di TGF-beta, SOD1 e APOE come sostanze potenzialmente neuroprotettive rilasciate dalla microglia nel mezzo di coltura condizionato ed in grado di proteggere neuroni primari cerebellari da alcuni tipi di neurotossicità

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

Amyotrophic lateral sclerosis: from research to therapeutic attempts and therapeutic perspectives.

Contestabile A.- *Curr Med Chem.* 2011;18(36):5655-65.

Role of nitric oxide in cerebellar development and function: focus on granule neurons.

Contestabile A. - *Cerebellum.* 2012 Mar;11(1):50-61.

Nitric oxide control of proliferation in nerve cells and in tumor cells of nervous origin.

Peña-Altamira E, Petazzi P, Contestabile A. - *Curr Pharm Des.* 2010;16(4):440-50.

Nitric oxide control of MYCN expression and multi drug resistance genes in tumours of neural origin.

Porro A, Chrochemore C, Cambuli F, Iraci N, Contestabile A, Perini G. - *Curr Pharm Des.* 2010;16(4):431-9

Targeting nitric oxide for tumor therapy.

Contestabile A. - *Curr Pharm Des.* 2010;16(4):378-80.

Transcriptional profiling in the lumbar spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: a role for wild-type superoxide dismutase 1 in sporadic disease?

D'Arrigo A, Colavito D, Peña-Altamira E, Fabris M, Dam M, Contestabile A, Leon A. - *J Mol Neurosci.* 2010 Jul;41(3):404-15.

The history of the cholinergic hypothesis.

Contestabile A. - *Behav Brain Res.* 2011 Aug 10;221(2):334-40

Valproic acid is neuroprotective in the rotenone rat model of Parkinson's disease: involvement of alpha-synuclein.

Monti B, Gatta V, Piretti F, Raffaelli SS, Virgili M, Contestabile A. - *Neurotox Res.* 2010 Feb;17(2):130-41.

Copper-Zinc Superoxide Dismutase (SOD1) Is Released by Microglial Cells and Confers Neuroprotection against 6-OHDA Neurotoxicity. - Polazzi E, Mengoni I, Caprini M, Peña-Altamira E, Kurtys E, Monti B.

Neurosignals. 2012 May 9. [Epub ahead of print] PMID: 22572742

Microglia and neuroprotection: from in vitro studies to therapeutic applications.
Polazzi E, Monti B. - Prog Neurobiol. 2010 Nov;92(3):293-315.

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Identificazione di ulteriori molecole neuroprotettive prodotte dalla microglia. Utilizzazione di quest conoscenze per trattamenti in vivo in modelli di malattie neurodegenerative.

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

Laboratorio di colture cellulari, laboratorio di proteomica, laboratorio di biochimica, microscopia a fluorescenza e confocale.

PAROLE CHIAVE

neurobiology, neurophysiology, neurochemistry, neuropharmacology, neurological disorders

UNITA' DI RICERCA INBB
Parma

RESPONSABILE SCIENTIFICO

CORRADINI ROBERTO

LINEA DI RICERCA

Sintesi e funzione biologica di acidi peptido nucleici PNA e loro modificazioni

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Corradini Roberto	PA	roberto.corradini@unipr.it
Manicardi Alex	BC	alex.manicardi@unipr.it
Bertucci Alessandro	DR	alessandro.bertucci@nemo.unipr.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Indirizzo Dipartimento di Chimica-Università di Parma- Parco Area delle Scienze 17/A 43124 Parma

Telefono +39-0521-905406

Fax +39-0521-905472

E-mail dip.chimica@unipr.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Milano

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

Sviluppo di nuove strutture di sintesi basate sul modello degli acidi peptido nucleici (PNA) per il riconoscimento selettivo di sequenze di DNA e RNA a scopo terapeutico e diagnostico. Studio degli aspetti strutturali dei PNA che conferiscono maggiore affinità o selettività nei confronti degli acidi nucleici.

Risultati ottenuti

Sono stati descritti PNA con modificazioni sul backbone che hanno mostrato proprietà migliorate in termini di affinità e di selettività. È stato elaborato un modello generale che collega la struttura delle modificazioni, in particolare gli aspetti stereochimici, con le prestazioni nelle interazioni con il DNA. Sono stati inoltre elaborati metodi per la funzionalizzazione delle nucleobasi. In campo terapeutico sono stati prodotti PNA che si sono rivelati efficaci nell'inibizione di oncogeni in tumori pediatrici, con efficacia dimostrata in studi preclinici su modelli murini (in Collaborazione con il gruppo del Prof. Andrea Pession, Università di Bologna). Sono stati messi a punto PNA anti-miR, curando in particolar modo l'introduzione di gruppi che facilitino la veicolazione cellulare. I PNA prodotti sono stati utilizzati in colture cellulari e hanno mostrato la capacità di inibire l'azione di miR coinvolti nel differenziamento cellulare e in patologie tumorali (in collaborazione con il gruppo del Prof. Roberto Gambari, Università di Ferrara).

In campo diagnostico sono state messe a punto metodologie basate su surface plasmon resonance imaging (SPRI) e nanoparticelle (in collaborazione con il gruppo del Prof. Giuseppe Spoto, Università di Catania) che permettono la rivelazione diretta di DNA estratto da campioni biologici senza amplificazione mediante PCR. Sempre in campo diagnostico sono stati prodotti i primi esempi di biosensori basati su fibre ottiche a cristallo fotonico in grado di riconoscere DNA in maniera altamente selettiva (in Collaborazione con il gruppo del Prof. Stefano Selleri, Università di Parma).

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

- 1) E. COSCELLI, M. SOZZI, F. POLI, D.E PASSARO, A. CUCINOTTA, S. SELLERI, R. CORRADINI, R. MARCHELLI. Towards Highly Specific DNA Biosensor: PNA-Modified Suspended Core Photonic Crystal Fiber *IEEE J Sel Top Quant* **2010**, 16, 967-972.
- 2) F. TOTSINGAN, V. JAIN, W. C. BRACKEN, A. FACCINI, T. TEDESCHI, R. MARCHELLI, R. CORRADINI, N. R. KALLENBACH, M. M. GREEN Conformational Heterogeneity in PNA:PNA Duplexes *Macromolecules* **2010**, 43, 2692-270.
- 3) R. D'AGATA, R. CORRADINI, C. FERRETTI, L. ZANOLI, M. GATTI, R. MARCHELLI, G. SPOTO
Ultrasensitive detection of non-amplified genomic DNA by nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance imaging *Biosensors and Bioelectronics* **2010**, 25, 2095-2100.
- 4) A. CALABRETTA, D. WASSERBERG, G.A. POSTHUMA-TRUMPIE, V. SUBRAMANIAM, A. VAN AMERONGEN, R. CORRADINI, T. TEDESCHI, S. SFORZA, D. N REINHOUDT, R. MARCHELLI, J. HUSKENS, P. JONKHEIJM. Patterning of Peptide Nucleic Acids Using Reactive Microcontact Printing *Langmuir* **2011**, 27, 1536-1542.
- 5) S. SFORZA, R. CORRADINI, T. TEDESCHI, R. MARCHELLI. Food analysis and food authentication by peptide nucleic acid (PNA)-based technologies *Chemical Society Reviews* **2011**, 40, 221-232.

- 6) A. TONELLI, T. TEDESCHI, A. GERMINI, S. SFORZA, R. CORRADINI, M. C. MEDICI, C. CHEZZI, Real time RNA transcription monitoring by Thiazole Orange (TO)-conjugated Peptide Nucleic Acid (PNA) probes: norovirus detection. *Mol. BioSyst.*, **2011**, 7, 1684–1692. DOI:10.1039/c0mb00353k.
- 7) R. CORRADINI, S. SFORZA, T. TEDESCHI, F. TOTSINGAN, A. MANICARDI, R. MARCHELLI. Peptide nucleic acids with a structurally biased backbone. Updated review and emerging challenges *Curr Top Med Chem* **2011**, 11, 1535-1554. DOI:10.2174/156802611795860979.
- 8) R. GAMBARI, E. FABBRI, M. BORGATTI, I. LAMPRONTI, A. FINOTTI, E. BROGNARA, N. BIANCHI, A. MANICARDI, R. MARCHELLI, R. CORRADINI Targeting microRNAs involved in human diseases: A novel approach for modification of gene expression and drug development *Biochemical Pharm* **2011**, 82, 1416-1429. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2011.08.007>
- 8) E. FABBRI, E. BROGNARA, M. BORGATTI, I. LAMPRONTI, A. FINOTTI, N. BIANCHI, S. SFORZA, T. TEDESCHI, A. MANICARDI, R. MARCHELLI, R. CORRADINI, R. GAMBARI miRNA therapeutics: delivery and biological activity of peptide nucleic acids targeting miRNAs *Epigenomics* **2011**, 3(6), 733–745. ISSN 1750-1911. Doi: 10.2217/EPI.11.90
- 9) R. TONELLI, A. MCINTYRE, C. CAMERIN, Z. S. WALTERS, K. DI LEO, J. SELFE, S. PURGATO, E. MISSIAGLIA, A. TORTORI, A. ASTOLFI, J. RENSHAW, K.R TAYLOR, S. SERRAVALLE, R. BISHOP, C. NANNI, L.J VALENTIJN, A. FACCINI, I. LEUSCHNER, S. FORMICA, J.S. REIS-FILHO, V. AMBROSINI, K. THWAY, M. FRANZONI, B. SUMMERSGILL, R. MARCHELLI, P. HRELIA, G. CANTELLI-FORTI, S. FANTI, R. CORRADINI, A. PESSION, J. SHIPLEY. Antitumor Activity of Sustained N-Myc Reduction in Rhabdomyosarcomas and Transcriptional Block by Antigene Therapy. *Clinical Cancer Res* **2012**, 18,796-807. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-11-1981
- 10) E. FABBRI, A. MANICARDI, T. TEDESCHI, S. SFORZA, N. BIANCHI, E. BROGNARA, A. FINOTTI, G. BREVEGLIERI, M. BORGATTI, R. CORRADINI, R. MARCHELLI, R. GAMBARI Modulation of the Biological Activity of microRNA-210 with Peptide Nucleic Acids (PNAs) *ChemMedChem* **2011**, 6, 2192-2202. DOI: 10.1002/cmdc.201100270
- 11) A. MANICARDI, E. FABBRI, T. TEDESCHI, S. SFORZA, N. BIANCHI, E. BROGNARA, R. GAMBARI, R. MARCHELLI, R. CORRADINI Cellular uptake, biostability and anti-miR-210 activity of chiral arginine-PNA in leukemic K562 cells. *ChemBiochem* **2012**, 13, 1327 – 1337, DOI:10.1002/cbic.201100745.

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Le ricerche proseguono con tre obiettivi principali: 1) ottenere PNA con basi modificate con alta selettività e affinità ; 2) realizzare PNA in grado di dare scissione idrolitica di RNA mediante organocatalisi; c) la modificazione dei PNA con diversi gruppi funzionali, per realizzare molecole polifunzionali che siano in grado di operare, oltre al riconoscimento di DNA e RNA, altre funzioni di interesse biologico e diagnostico (carriers, gruppi reporter e siti catalitici). Realizzazione di nuove applicazioni in sistemi cellulari.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

Peter E. Nielsen at the Panum Institute, University of Copenhagen (Denmark).

Juriaan Huskens, University of Twente (The Netherlands)

Stavros Pissadakis, Foundation for Research and Technology-Hellas (FORTH) (Greece)

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

NMR Varian INOVA 600 MHz

NMR Bruker Avance 400 MHz

Spettropolarimetro CD JASCO 712

Sintetizzatore di peptidi SYRO-1

UPLC-MS Aquity con rivelatore ESI-SQ

Lettore di microarray ScanArray (Perkin Elmer)

PAROLE CHIAVE

PE5_23 Organic chemistry

PE5_16 Biological chemistry

PE5_22 Supramolecular chemistry

LS1_1 Molecular biology and interactions

LS2_8 Epigenetics and gene regulation

UNITA' DI RICERCA INBB
Modena

RESPONSABILE SCIENTIFICO

D'ARCA DOMENICO

LINEA DI RICERCA

Durante lo sviluppo neoplastico, I geni oncosoppressori rivestono un ruolo fondamentale. Recentemente abbiamo clonato e caratterizzato la funzione di una nuova proteina mitocondriale, chiamata MITOSTATIN. Quest'ultima è dotata di attività oncosoppressive ed il suo gene è localizzato sul cromosoma 12q24, una regione che presenta una alta frequenza di delezioni in una varietà di neoplasie maligne. MITOSTATIN è una proteina di circa 62 kDa e risulta ubiquitaria. I nostri risultati hanno evidenziato delezioni e mutazioni del gene di MITOSTATIN in circa il 5% di varie linee cellulari tumorali e in circa l'11% di tumori solidi di varie origini. La overespressione transitoria di MITOSTATIN in cellule, causa l'inibizione della formazione di colonie in vitro, la crescita tumorale in vivo e risulta proapoptotica (caratteristiche condivise dai classici geni oncosoppressori). Viceversa, le cellule knockout per MITOSTATIN hanno mostrato un'aumento della crescita ed un aumentata sopravvivenza. L'espressione di MITOSTATIN è stata inoltre trovata significativamente ridotta nei tumori della vescica, del seno e della prostata (riduzione associata agli stadi più avanzati del tumore). Recentemente abbiamo trovato una importante relazione tra la overespressione di MITOSTATIN e la riduzione dei livelli di proteina e dello stato di fosforilazione della Heat-shock protein 27 (Hsp27). Hsp27 ha proprietà citoprotettive ben note, interferisce direttamente con l'attivazione di caspasi e regola la riorganizzazione del citoscheletro. Tutti questi risultati supportano l'ipotesi che MITOSTATIN ha molte caratteristiche comuni ai classici oncosoppressori, suggerendo un suo possibile coinvolgimento nello sviluppo e progressione del cancro. La nostra attività di ricerca è volta ad ottenere una più approfondita caratterizzazione delle funzioni fisiologiche di MITOSTATIN, che potrebbero portare allo sviluppo di nuove terapie per i tumori maligni.

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Domenico D'Arca	RU	Domenico.darca@unimore.it
Arnaldo Corti	PO	arnaldo.corti@unimore.it
Pier Paola Davalli	RU	pierpaola.davalli@unimore.it

Non Aderenti INBB

Andrea Martello	BC	martelloandrea@gmail.com
-----------------	----	--------------------------

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Indirizzo Via campi 287, Università di Modena e Reggio Emilia, Dip. di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, 41125 (MO).

Telefono +39 0592055610

Fax +39 0592055410

E-mail domenico.darca@unimore.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Bologna

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

Ottenere una più approfondita caratterizzazione delle funzioni fisiologiche di MITOSTATIN, che potrebbero portare allo sviluppo di nuove terapie per i tumori.

Risultati ottenuti

Abbiamo iniziato ad indagare su alcuni aspetti significativi delle funzioni di MITOSTATIN (PlosOne 2011, Oncogene 2009) i quali costituiscono la premessa scientifica della nostra ricerca:

La nostra ricerca attuale si concentra in modo specifico sullo studio funzionale di MITOSTATIN nel cancro alla prostata. Abbiamo effettuato una serie di esperimenti usando diverse linee cellulari tumorali prostatiche, i risultati ottenuti hanno evidenziato che l'espressione ectopica di MITOSTATIN in queste cellule causa l'inibizione della crescita cellulare, della migrazione, invasione, adesione e della formazione di tumori in vivo, al contrario effetti opposti si osservano in seguito a deplezione della stessa proteina. Abbiamo inoltre effettuato esperimenti di immunostochimica su tissuearray di tumori prostatici e relativa controparte normale ed abbiamo osservato che i livelli proteici di espressione di MITOSTATIN risulta inversamente correlata con le fasi avanzate del cancro. Esperimenti recenti hanno inoltre evidenziato che cellule, in cui MITOSTATIN è stata depleta, presentavano un chiaro aumento dei livelli di superossidi in seguito a stress esogeno rispetto alle cellule non trattate. Livelli alti di superossidi sono noti per essere capaci di facilitare la trasformazione cellulare e di indurre instabilità genomica (Hyun-Seok Kim et al., 2010). L'ipotesi è che MITOSTATIN potrebbe agire come una proteina capace di regolare la fisiologia mitocondriale, e che la perdita della sua espressione / funzione potrebbe favorire la trasformazione cellulare.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

1. Pierpaola Davalli, Federica Rizzi, Andrea Caporali, Davide Pellacani, Serena Davoli, Saverio Bettuzzi, Maurizio Brausi, Domenico D'Arca. (2012) "Anticancer activity of green tea polyphenols in prostate gland". Oxid Med Cell Longev. 2012;2012:984219. Epub 2012 May 15. (Affiliazione INBB).
2. Fassan M, D'Arca D, Letko J, Vecchione A, Gardiman MP, McCue P et al. (2011) "Mitostatin is down-regulated in human prostate cancer and suppresses the invasive phenotype of prostate cancer cells". PLoS One. 2011 May 6;6(5):e19771.
3. Domenico D'Arca, Xudong Zhao, Wenming Xu, Nadya C. Ramirez-Martinez, Antonio Iavarone and Anna Lasorella. (2010) "The Huwe1 ubiquitin ligase is essential to synchronize neuronal and glial differentiation in the developing cerebellum". Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Mar 30; 107(13):5875-80. Epub 2010 Mar 15.
4. D'Arca D, LeNoir J, Wildemore B, Gottardo F, Bragantini E, Shupp-Byrne D, Zanesi N, Fassan M, Croce CM, Gomella LG, Baffa R. (2009) "Prevention of bladder cancer in the FHIT knock-out mouse model with ROFECOXIB, a Cox-2 inhibitor". Urol Oncology: Seminars and Original investigations. 2010 Mar-Apr; 28(2):189-94. Epub 2009 Apr 16

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Il nostro obiettivo è quello di ottenere una più approfondita caratterizzazione delle funzioni fisiologiche di MITOSTATIN (nuovo oncosoppressore mitocondriale), che potrebbero portare allo sviluppo di nuove terapie per i tumori maligni.

La ricerca si svolgerà come segue: 1) Analisi del coinvolgimento di MITOSTATIN nel metabolismo ossidativo mitocondriale e nell'instabilità cromosomica. 2) Studio dei meccanismi molecolari attraverso i quali MITOSTATIN favorisce l'apoptosi. 3) Analisi sistematica mutazionale di MITOSTATIN in molti tessuti tumorali di diversa origine, con particolare attenzione a quello prostatico (Tissue Bank). I tessuti tumorali in paraffina e congelati, verranno anche utilizzati per l'analisi di immunohistochimica e di immunoblot per valutare l'espressione della proteina. 4) Analisi dello stato di metilazione del promotore di MITOSTATIN. 7) Studio delle modifiche post-traduzionali di MITOSTATIN che potrebbero essere responsabili della regolazione dell'attività/stabilità della proteina stessa. 8) Al fine di individuare possibili "partners proteici" di MITOSTATIN, un'analisi di spettrometria di massa verrà effettuata dopo immunoprecipitazione preparativa. 9) Generazione di topi mutanti "conditional knockout" per MITOSTATIN (modello *in vivo*).

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

1. YCR Department of Biology, University of York, UK.
2. Institution Division of Experimental Cardiovascular Medicine, University of Bristol, Bristol, UK.
3. Department of Neurology and Institute for Cancer Genetics, Columbia University, New York, USA

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

1. Automated immunostainer Benchmark (Ventana);
2. Fluorescent microscope (Axioskop, Zeiss);
3. Laser capture microdissection apparatus (Laser Microdissection Systems CKX41, Olympus);
4. 4 Thermocyclers (PTC-200, MJ Research; T3 Thermocycler, Biometra; C1000 Thermal Cycler, BioRad);
5. MJ MiniOpticon Real-time PCR system (BioRad); emitted fluorescence is analyzed by specific software (MJ Opticon Monitor, Analysis Software, BioRad);
6. Automatic Sequencer ABI Prism 310 (Applied Biosystem);

PAROLE CHIAVE

1. Oncosoppressore
2. Tumori solidi
3. Apoptosi
4. Instabilità genomica
5. Modificazioni post-traduzionali

UNITA' DI RICERCA INBB
Catania

RESPONSABILE SCIENTIFICO
DE PINTO VITO

LINEA DI RICERCA 1:

Proteine canale mitocondriali: coinvolgimento in apoptosi ed equilibrio redox cellulare

LINEA DI RICERCA 2:

Messa a punto di devices per l'analisi rapida di provenienza e salubrità del pescato

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Vito De Pinto	PO	vdpbiofa@unict.it
Angela Messina	RU	mess@unict.it
Francesca Guarino	RU	paola14225@yahoo.com
Simona Reina	BC	simonareina@yahoo.it
Cludia Fichera	DR	claudia_fichera@yahoo.it
Annamaria Pappalardo	DR	pappalam@unict.it
Andrea Magri	DR	andrea.chimbiomol@yahoo.it
Agata Impellizzeri	DR	agata.impellizzeri@yahoo.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare, Dip. di Scienze Biologiche Geologiche Ambientali, Università di Catania

Indirizzo viale A. Doria, 6

Telefono 095-7384244, 7384243, 7384092.

URL: www.unictbiolmol-lab.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Catania

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Linea di ricerca 1 - proteine canale mitocondriali

1) Studi di relazione struttura-attività di chimere per swapping di domini tra le isoforme umane della porina eucariotica o VDAC (*Voltage Dependent Anion Selective Channel*). Queste proteine sono state caratterizzate sia dal punto di vista funzionale tramite incorporazione in membrane planari ed esperimenti di elettrofisiologia, che dal punto di vista biologico in sistemi modello cellulari.

2) Caratterizzazione ed isolamento delle isoforme 2 e 3 del VDAC. Questo studio ha permesso di ottenere per la prima volta la purificazione di queste isoforme. In particolare sono state oggetto del nostro studio le cellule germinative sia di mammiferi (spermatozoo bovino) che di insetto (ovarii e spermatozoi di *Drosophila melanogaster*). In entrambi questi sistemi modello, sembra emergere un ruolo differenziato tra le isoforme di VDAC con probabili interazioni di esse con proteine cellulari extra-mitocondriali.

3) Produzione di canali artificiali basati su strutture naturali (porine e VDAC) allo scopo di produrre sistemi canale utilizzabili in applicazioni biosensoristiche che richiedono diametri definiti e costanti dei canali.

Risultati ottenuti

1) Costruzione di chimere tra le isoforme di VDAC attraverso lo swapping di domini proteici. Questa strategia ha permesso di individuare domini rilevanti dal punto di vista funzionale. Le chimere sono state saggiate attraverso exp di complementazione in lieviti privi del gene endogeno per VDAC. Il grado di complementazione e di resistenza agli agenti pro-apoptotici o produttori di ROS indica una specializzazione di particolari domini. Le chimere in cui il dominio N-terminale di VDAC1 o 2 sono stati innestati su VDAC3, al posto del rispettivo dominio, sono risultati molto resistenti ed hanno determinato il raddoppio del life-span delle cellule riceventi, rispetto ai lieviti wt di controllo.

2) Costruzione di proteine-canale artificiali. Per la prima volta abbiamo costruito pori artificiali basati su un modulo beta-hairpin naturale, cioè ricopiato dalla porina batterica OmpF. In questo lavoro abbiamo messo a punto una strategia di costruzione modulare della proteina, per la quale lo stesso modulo beta-hairpin è stato multimerizzato, permettendo di ottenere dal dimero all'ottamero del beta-hairpin. In questo modo si mira a costruire pori con diametro "su misura". Poiché questi pori derivano da proteine transmembrana, l'obiettivo finale è il loro utilizzo in sistemi biosensoristici.

3) Definizione del ruolo fisiologico delle isoforme alternative di VDAC in *D. melanogaster*: risulta evidente il coinvolgimento di questi geni nello sviluppo dei tessuti germinativi dell'insetto.

Linea di ricerca 2 - messa a punto di devices per l'analisi rapida di provenienza e salubrità del pescato

In questa linea di ricerca ci siamo interessati della ricerca di marcatori molecolari di specie e di popolazione sufficientemente corti da poter essere in seguito implementati su sistemi miniaturizzati e portatili. La nostra ricerca si è rivolta allo studio della specie *Xiphias gladius* (pesce spada). Abbiamo studiato le relazioni filogenetiche tra popolazioni di questo pesce catturate in aree diverse (Mediterraneo, Atlantico, Indo-Pacifico). La costruzione di alberi basati su aplotipi ha reso semplice ed immediato il riconoscimento della provenienza geografica, oltre che della specie, per campioni incogniti. Il nostro studio ha quindi avuto riscontri ed apprezzamenti anche nel pubblico non-scientifico. Ci proponiamo per il futuro di allargare le nostre investigazioni ad altre specie di interesse commerciale e a monitorare altri parametri di salubrità quali contaminanti ed interferenti endocrini. Lo scopo finale sarà quello di rendere disponibile al pubblico e alle autorità di controllo sistemi automatizzati in grado di effettuare queste analisi.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012 (asteriscate le pubblicazioni che riportano l'affiliazione all'INBB)

- 1) AM. Amorini, M. Tuttobene, F.M. Tomasello, F. Biazzo, S. Gullotta, V. De Pinto, G. Lazzarino, B. Tavazzi. *Glucose ameliorates the metabolic profile and mitochondrial function of platelet concentrates during storage in autologous plasma* (2012) *Blood Transfusion*, 13, 1-10
- *2) A. Messina, S.Reina, F. Guarino and V. De Pinto *VDAC isoforms from mammals* (2012) *Biochim Biophys Acta*, 1818, 1466-1476
- *3) D. De Stefani, A.Bononi, A. Romagnoli, A. Messina, V. De Pinto, P. Pinton and R. Rizzuto *VDAC1 selectively transfers apoptotic Ca(2+) signals to mitochondria* (2012) *Cell Death and Differentiation* 19, 267-273
- *4) A.M. Pappalardo, F. Guarino, S. Reina, A. Messina and V. De Pinto *Geographically widespread swordfish barcode stock identification: a case study of its application* (2011) *PLOS ONE* 6, 10: e25516
- *5) M. Lolicato, S. Reina, A. Messina, F. Guarino, M. Winterhalter, R. Benz and V. De Pinto *Generation of artificial channels by multimerization of β -strands from natural porin*. (2011) *Biol. Chem.* 392, 617-24
- *6) V. De Pinto, S. Reina, F. Tomasello, F. Guarino, A. Messina *Investigations on N-Terminal Chimeras of VDAC Isoforms* (2011) *Bioph. J.* 100, S. 1, 250a-251a
- *7) S. Reina, V. Palermo, A. Guarnera, F. Guarino, A. Messina, C. Mazzoni, V. De Pinto. *Swapping of the N-terminus of VDAC1 with VDAC3 restores full activity of the channel and confers anti-aging features to the cell*. *FEBS Letters* (2010) 584, 2837-44
- *8) V. Shoshan-Barmatz, V. De Pinto, M. Zweckstetter, Z. Raviv, N. Keinan, N. Arbel. *VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death*. (2010) *Mol. Aspects Med.* 31, 227-85
- *9) V. De Pinto, A. Messina, D.J. Lane, A. Lawen. *Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) in the plasma membrane*. (2010) *FEBS Lett.* 584, 1793-9
- *10) V. De Pinto, S. Reina, A. Guarnera, F. M. Tomasello, F. Guarino, A. Messina. *Role of the N-terminal moiety in VDAC isoforms* (2010) *Bioph. J.* 98, 3, Supp. 1, 208a
- *11) V. De Pinto, F. Guarino, A. Guarnera, A. Messina, S. Reina, F. Tomasello, V. Palermo, C. Mazzoni. *Characterization of human VDAC isoforms: A peculiar function for VDAC3?* (2010) *Biochim Biophys Acta.* 1797, 1268-75

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

- 1) Cristallizzazione e modelling delle isoforme VDAC2 e 3. Studi di docking con farmaci.
- 2) Coinvolgimento della porina mitocondriale VDAC in patologie di interesse metabolico. Questo studio utilizza anche il lievito *S. cerevisiae* come sistema modello. In questo studio verranno utilizzate proteine chimeriche basate sui modelli umani e di esse verrà verificata la funzionalità sulla base di utilizzazione di ceppi di lievito privi delle porine endogene o di linee cellulari umane opportunamente silenziate o delete dei VDAC endogeni. Le patologie che verranno indagate sono la SLA, il Parkinson's e alcune forme di tumore linfocitario, in cui VDAC è stato chiamato in causa.
- 3) Realizzazione di dispositivi biosensoriali o a microchip da poter usare per applicazioni di tracciabilità e rintracciabilità molecolare di specie e per l'analisi di salubrità alimentare attraverso lo studio di interferenti endocrini diffusi nell'ambiente marino.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

Prof. Mathias Winterhalter, Jacobs University, Bremen, Germany
Prof. Sebastian Hiller, Biozentrum, Basel University, Germany
Prof. Varda Shoshan-Barmatz, Negev Institute of Technology, Beer Sheva, Israel

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

Confocal Microscope Olympus Fluo View 1000 (a disposizione, non di proprietà)
Sistema per elettroforesi bidimensionale Bio-Rad basato su Protean 1000 IEF e vari sistemi di SDS-PAGE.
Real Time PCR Real Plex Eppendorf
Robot per esperimenti di cristallizzazione
Sistemi biochimici e cromatografici per l'espressione e la purificazione di proteine ricombinanti

PAROLE CHIAVE

LS3_6 Organelle biology

LS3_4 Apoptosis

LS1_6 Biophysics

LS9_1 Genetic engineering, transgenic organisms, recombinant proteins, biosensors

LS8_8 Environmental and marine biology

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

RESPONSABILE SCIENTIFICO

DIANO NADIA

Linea di Ricerca

Implementazione Di Processi Biotecnologici Per L'ambiente E La Salute

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Damiano Gustavo Mita	PO	mita@igb.cnr.it
Nadia Diano	RU	diano@igb.cnr.it nadia.diano@unina2.it
Luigi Mita	Giovane Ricercatore FIRB	drluigi.mita@libero.it
Non Aderenti INBB		
Umberto Bencivenga	PT - CNR	benciven@igb.cnr.it
Sergio Rossi	PT - CNR	rossi@igb.cnr.it
Carla Nicolucci	BC	nicolucci@igb.cnr.it
Mariangela Bianco	BC	mariangelabianco@hotmail.com
Ciro Menale	PhD	menale@igb.cnr.it
Maria Teresa Piccolo	BC	mariateresa.piccolo@igb.cnr.it
Vincenzo Barba	BC	vinc.barba@gmail.com

SEDE UNITÀ DI RICERCA

a)- Dipartimento di Medicina Sperimentale – Facoltà di Medicina e Chirurgia – Seconda Università di Napoli

Indirizzo: Via S. Maria di Costantinopoli 16, 80138 – Napoli

Tel 081/5665822

Fax 081/5665822

E-mail nadia.diano@unina2.it

b)- Istituto di Genetica e Biofisica “Adriano Buzzati Traverso” del CNR

Indirizzo: Via Pietro Castellino, 111 – 80131 - Napoli

Tel 081/6132428

Fax 081/6132608

E-mail diano@igb.cnr.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Napoli

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

L'UdR di Napoli, nell'ultimo triennio ha focalizzato la sua attività di ricerca al **campo dell'Ambiente e Salute**, interessandosi: a) al (bio)risanamento di acque inquinate da interferenti endocrini (IE) mediante prototipi di bioreattori realizzati su scala di laboratorio; b) alla determinazione di tali composti mediante tecniche analitiche (HPLC) o biotecnologiche (YES test) in tessuti animali ed in fluidi biologici; c) allo studio degli effetti *in vitro* ed *in vivo* della esposizione ad IE di linee cellulari e interi organismi; d) alla ricerca di correlazioni tra esposizione ad IE e patologie sociali come l'endometriosi e l'obesità.

Recentemente l'UdR si è interessata alla realizzazione di sistemi di drug delivery che prevedono l'utilizzo di nanoparticelle di polimeri biodegradabili in cui incapsulare farmaci di interesse.

Risultati ottenuti

a) *Biorisanamento di acque inquinate da interferenti endocrini*

Per biorimediare le acque inquinate da IE, si sono realizzati due prototipi da laboratorio: un bioreattore non isoterma ed un bioreattore isoterma a letto fluido.

Nel primo caso si è realizzato un particolare tipo di bioreattore a membrana impiegante membrane idrofobiche rese catalitiche. Come modello di IE, sono stati studiati dei composti fenolici, tra cui il Bisfenolo A, ed il dimetilftalato, appartenente al gruppo dei ftalati. Sono stati utilizzati diversi tipi di enzima a seconda della sostanza da biodegradare: laccasi e tirosinasi per i fenoli, lipasi per il dimetilftalato. In condizioni non isoterme la degradazione enzimatica è risultata un centinaio di volte maggiore rispetto a quella ottenuta in condizioni isoterme, soprattutto a basse

concentrazioni di inquinante, ossia a concentrazioni plausibili nelle acque superficiali (n. 1 e 3 dell'elenco delle pubblicazioni).

Nel secondo caso, beads di polyacrylonitrile (PAN) su cui sono stati immobilizzati gli enzimi Laccasi e Tirosinasi sono stati realizzati per riempire un reattore tubolare. Gli IE presi come modello appartengono alla classe dei bisfenoli, in particolare sono stati utilizzati il Bisfenolo A (BPA), Bisfenolo B (BPB), Bisfenolo F (BPF) e Tetraclorobisfenolo A (TCBPA). Si osserva che nelle condizioni sperimentali utilizzate, 90 minuti di trattamento con l'enzima laccasi sono sufficienti per ottenere la biodegradazione completa di BPA, BPB e BPF. Confrontando invece la potenza catalitica dei due sistemi, la Laccasi ha mostrato avere maggiore potenza catalitica rispetto alla Tirosinasi. Per entrambi gli enzimi, il BPF è il substrato verso il quale gli enzimi hanno maggiore capacità di biodegradazione (n. 6 dell'elenco delle pubblicazioni).

Lo stesso bioreattore è stato utilizzato per la biodegradazione di clorofenoli. I risultati ottenuti confermano la possibilità di utilizzo di tale sistema per il disinquinamento di acque reflue (n. 10 dell'elenco delle pubblicazioni).

b) Si sono implementate metodologie analitiche e biologiche indirizzate a determinare la presenza di sostanze attive a livello endocrino in campioni di tessuto animale ed in fluidi biologici. Dopo il necessario pre-trattamento, i campioni di tessuto sono analizzati mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) dotata di rivelatore diodi array e fluorimetrico. La spettrometria di massa è utilizzata per confermare l'identità degli analiti.

c) *Studio degli effetti di interferenti endocrini in vitro ed in vivo*

c.1) Si è studiato l'effetto di differenti concentrazioni di BPA e di altri composti fenolici dotati di attività estrogenica, enzimicamente degradati e non, sulla proliferazione cellulare, sull'indice di vitalità e sul ciclo cellulare. Si è trovato che dopo il trattamento enzimatico queste sostanze perdono le loro proprietà estrogeniche (n. 11 dell'elenco delle pubblicazioni).

c.2) Si è studiata la concentrazione di BPA in pesci li largo consumo pescati nel golfo di Napoli e lungo le coste laziali. Organi esaminati sono stati il muscolo, il fegato ed il cervello (n. 5 dell'elenco delle pubblicazioni).

c.3) Si sono studiate le concentrazioni di octilfenolo nelle differenti aree del cervello in ratti esposti per 20 giorni ad octilfenolo mediante iniezioni sottocutanee di questo interferente endocrino (n. 7 dell'elenco delle pubblicazioni).

d) *Studio di correlazioni tra esposizione ad interferenti endocrini e patologie sociali*

d.1) Si è studiata l'eventuale correlazione tra esposizione a Bisfenolo A ed insorgenza di endometriosi. Gli esperimenti sono stati effettuati sulla prole di topi Balbi c esposti sin dall'inizio della fecondazione a due differenti dosi di interferente endocrino. I risultati hanno confermato: a) la presenza di una correlazione positiva tra esposizione a Bisfenolo A ed insorgenza di endometriosi; b) una differente concentrazione di Bisfenolo A nel fegato, nel cervello e nel muscolo dipendente dal genere della prole (n. 4 e 9 dell'elenco delle pubblicazioni).

d.2) È stato condotto uno studio che ha coinvolto più di 100 bambini residenti nella Regione Campania, che presenta il 48.8% di persone con eccesso di peso in età compresa tra 6 e 11 anni. Lo scopo del lavoro è stato stimare la quantità di BPA nelle urine dei bambini obesi e normopeso, per valutare una correlazione tra questo interferente endocrino e l'obesità infantile.

e) *drug delivery*

Si sono costruite e caratterizzate nanoparticelle di acido poli(lattico-co-glicolico), conosciuto con la sigla PLGA, contenenti cisplatino. In funzione della concentrazione del farmaco e del tempo, si è studiato l'effetto citotossico delle nanoparticelle contenenti cisplatino. I parametri studiati sono stati la sopravvivenza cellulare e l'attività e/o l'espressione di alcune proteine effettrici della "apoptosi" quali l'attività della caspasi 3 e l'espressione della proteina p53. La sopravvivenza cellulare e l'attività della caspasi 3 sono paragonabili con quelle del farmaco libero indicando così l'efficacia terapeutica delle nostre nano particelle realizzate.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

1. L. Mita, V. Sica, M. Guida, C. Nicolucci, T. Grimaldi, L. Caputo, M. Bianco, S. Rossi, U. Bencivenga, M.S. Mohy Eldin, M.A. Tufano, D.G. Mita, N. Diano. **Employment of immobilised lipase from *Candida rugosa* for the bioremediation of waters polluted by dimethylphthalate, as a model of endocrine disruptors.** *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 62 (2010) 133-141.
2. M. Portaccio, D. Di Tuoro, F. Arduini, M. Lepore, D.G. Mita, N. Diano, L. Mita, D. Moscone. **A thionine-modified carbon paste amperometric biosensor for catechol and bisphenol A determination.** *Biosensors and Bioelectronics* 25 (2010) 2003-2008
3. S. Georgieva, T. Godjevargova, D.G. Mita, N. Diano, C. Menale, C. Nicolucci, C. Romano Carratelli, L. Mita, E. Golovinsky. **Non isothermal bioremediation of waters polluted by phenol and some of its derivatives by laccase covalently immobilized on polypropylene membranes.** *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 66 (2010) 210-218.
4. Signorile, P.G., Spugnini, E.P., Mita, L., Mellone, P., D'Avino, A., Bianco, M., Diano, N., Caputo, L., Rea, F., Viceconte, R., Portaccio, M., Viggiano, E., Citro, G., Pierantoni, R., Sica, V., Vincenzi, B., Mita, D.G., Baldi, F., Baldi, A. **Pre-natal exposure of mice to bisphenol A elicits an endometriosis-like phenotype in female offspring.** *Gen. and Comp. Endocrinol.* 168 (2010) 318-325.

5. Mita L, Bianco M, Viggiano E, Zollo F, Bencivenga U, Sica V, Monaco G, Portaccio M, Diano N, Colonna A, Lepore M, Canciglia P, Mita DG. **Bisphenol A content in fish caught in two different sites of the Tyrrhenian Sea (Italy).** *Chemosphere* 82 (2011)405-10.
6. Nicolucci C, Rossi S, Menale C, Godjevargova T, Ivanov Y, Bianco M, Mita L, Bencivenga U, Mita DG, Diano N. **Biodegradation of bisphenols with immobilized laccase or tyrosinase on polyacrylonitrile beads.** *Biodegradation* 22 (2011) 673-83
7. M. Bianco, L. Mita, M. Portaccio, N. Diano, V. Sica, B. De Luca, D.G. Mita, C. Romano Carratelli, E. Viggiano. **Differential accumulation levels in the brain of rats exposed to the endocrine disruptor 4-tert-octylphenol (OP).** *Environ Toxicol Pharmacol.* 3 (2011) 198-204.
8. Delfino, I., Camerlingo, C., Portaccio, M., Ventura, B.D., Mita, L., Mita, D.G., Lepore, M. **Visible micro-Raman spectroscopy for determining glucose content in beverage industry** *Food Chemistry* 127 (2011) 735-742
9. L. Mita, A. Baldi, N. Diano, E. Viggiano, M. Portaccio, C. Nicolucci, L. Grumiro, C. Menale, D.G. Mita, E.P. Spugnini, R. Viceconte, G. Citro, R. Pierantoni, V. Sica, M. Marino, P.G. Signorile, M. Bianco. **Differential accumulation of BPA in some tissues of offspring of Balb-C mice exposed to different BPA doses.** *Environ Toxicol Pharmacol.* (2012) 33: 9–15.
10. **C. Menale, C. Nicolucci, M. Catapane, S. Rossi, U. Bencivenga, D.G. Mita, N. Diano.** Optimization of operational conditions for biodegradation of chlorophenols by laccase-polyacrylonitrile beads system. *J Mol Catal. B, Enzym* 78 (2012) 38– 44
11. L. Pisapia, G. Del Pozzo, P. Barba, L. Caputo, L. Mita, E. Viaggiano, G.L. Russo, C. Nicolucci, S. Rossi, U. Bencivenga, D.G. Mita, N. Diano **Effects of some Endocrine Disruptors on cell cycle progression and murine dendritic cell differentiation.** *Gen Comp End* 178 (2012) 54-63
12. Ivanov, Y., Marinov, I., Portaccio, M., Lepore, M., Mita, D.G., Godjevargova, T. **Flow-injection system with site-specific immobilization of acetylcholinesterase biosensor for amperometric detection of organophosphate pesticides.** *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 26 (2012) 3044-3053

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Le prospettive, ed i conseguenti obiettivi, per i prossimi anni, riguardano: 1) l'ottimizzazione di supporti catalitici da utilizzare in bioreattori; 2) lo scale-up dei bioreattori attualmente in uso, da bioreattori di dimensioni da laboratorio a prototipi di tipo industriale; 3) esperimenti in vitro su adipociti umani differenziati e trattati con BPA per provare l'esistenza di una correlazione tra l'esposizione al BPA e la predisposizione al diabete di tipo II; 4) studio del rilascio di interferenti endocrini nei cibi inscatolati; 5) l'ottimizzazione delle procedure di realizzazione di nanoparticelle polimeriche per il rilascio dei farmaci da utilizzare in esperimenti in vivo.

PROGETTI FINANZIATI

“Sviluppo di procedure di biorisanamento e di nuovi sistemi di analisi per Interferenti Endocrini” nell'ambito del Fondo per gli Investimenti della Ricerca di Base (FIRB), **annualità 2008**;

Ricerca Finalizzata 2008 “Innovative approaches in the evaluation and prevention of the food exposure to contaminant toxic persistent and emergent, through the study of the diet and the debugging of innovative methods of survey”;

Ricerca Finalizzata 2009 “Food and environmental safety: the problem of the endocrine disruptors”.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

- a) Department of Ob/Gyn & Reproductive Sciences and Department of Neurobiology, Program in Integrative Cell Signaling and Neurobiology of Metabolism, Medical School of Yale University;
- b) Laboratory of Bioactive Polymers, Institute of Polymers, Bulgarian Academy of Science (BAS), Sofia, Bulgaria, nell'ambito di un accordo di Collaborazione CNR/BAS e INBB/BAS;
- c) Polymers Research Department, Mubarak City for Scientific Research and Technology Applications (MuCSAT), Alexandria, Egitto, Prof. M.S. Mohy Eldin, Prof. M.M. El-Masry, Prof. H. El-Sherif, nell'ambito di scambi culturali Italia/Egitto;
- d) Department of Biotechnology, University “A Zlatov”, Burgas, Bulgaria, Prof. T. Godjevargova, nell'ambito di un accordo di collaborazione INBB/University of Burgas.

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

Apparecchiatura generatrice di plasma –Spettrofotometro – HPLC ionico – HPLC-diode array/fluorimetro – HPLC-MS.

PAROLE CHIAVE

LS7_11 Environment and health risks including radiation

LS8_9 Environmental toxicology

PE4_6 Analytical chemistry

PE5_10 Nanomaterials : nanoparticles, nanotubes

PE8_13 Industrial bioengineering

11. E. Saino, M.L. Focarete, C. Gualandi, E. Emanuele, A.I. Cornaglia, M. Imbriani, L. Visai “*Effect of Electrospun Fiber Diameter and Alignment on Macrophage Activation and Secretion of Proinflammatory Cytokines and Chemokines*” **Biomacromolecules**, 12, 1900–1911 (2011).
12. C. Gualandi, M. Soccio, M. Govoni, S. Valente, N. Lotti, A. Munari, E. Giordano, G. Pasquinelli, M.L. Focarete. *Poly(butylene/diethylene glycol succinate) Multiblock Copolyester as a Candidate Biomaterial for Soft Tissue Engineering: Solid State Properties, Degradability and Biocompatibility*, Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 27(3) 244–264 (2012).
13. E. Saino, M.L. Focarete, C. Gualandi, N. Bloise, M. Imbriani, L. Visai. *Electrospun fiber morphology effect on immune response*, Current Opinion in Biotechnology, 2011, 22S, S152
14. S. Mukherjee, C. Gualandi, M.L. Focarete, R. Ravichandran, J.R. Venugopal, M. Raghunath, S. Ramakrishna. *Elastomeric electrospun scaffolds of poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate) for myocardial tissue engineering*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2011, 22, 1689-1699
15. C. Gualandi, M. Soccio, E. Saino, M.L. Focarete, N. Lotti, A. Munari, L. Moroni, L. Visai, “*Easily synthesized novel biodegradable copolyesters with adjustable properties for biomedical applications*” Soft Matters, 2012, 8, 5466.
16. S. Panzavolta, B. Bracci, M.L. Focarete, C. Gualandi, A. Bigi, “*Fiber reinforcement of a biomimetic bone cement*” J Mater Sci: Mater Med (2012) 23:1363–1370.

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Nell’ambito dei materiali porosi per l’ingegneria dei tessuti si intende implementare la funzionalità degli ‘scaffold’ polimerici sia tramite l’introduzione di molecole bio-attive all’interno dello scaffold per un loro successivo rilascio, che mediante funzionalizzazione superficiale con bio-molecole specifiche. Tali scaffold saranno utilizzati nello studio del differenziamento di cellule staminali. Sempre nell’ambito dell’ingegneria dei tessuti si svilupperanno inoltre materiali elettrofilati a diversa geometria, da impiegarsi anche associati a cellule staminali mesenchimali autologhe per la riparazione di lesioni neurologiche.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

- Prof. Richard A. Gross, Center for Biocatalysis and Bioprocessing of Macromolecules della National Science Foundation , Polytechnic University, Brooklyn-Long Island, New York (USA)
- Prof. Seeram Ramakrishna, NUS Nanoscience and Nanotechnology Initiative, National University of Singapore
- Prof. Nicola Tirelli, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences University of Manchester (UK)

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L’UNITÀ DI RICERCA

- 1) apparecchiatura per elettrofilatura con raccolta fibre in condizioni statiche e dinamiche, con controllo di temperatura e umidità
- 2) attrezzature per analisi termica (calorimetria, attrezzatura per analisi termogravimetrica accoppiata a spettrometria di massa, spettroscopia dinamico meccanica e dielettrica)
- 3) attrezzature per diffrazione di raggi-X ad alto e basso angolo e per spettrometria NMR, IR, UV
- 4) attrezzature per microscopia ottica in luce polarizzata con tavolino riscaldante, microscopia elettronica a scansione e microscopia a forza atomica
- 5) Strumentazione per misure di angolo di contatto
- 6) Dinamometro per prove tensili

PAROLE CHIAVE

Ingegneria dei tessuti, scaffold polimerici, elettrofilatura, biomateriali, nanostrutture

UNITA' DI RICERCA INBB
Laboratorio Nazionali di Osilo

RESPONSABILE SCIENTIFICO

FRANCONI FLAVIA

LINEA DI RICERCA

Biologia cellulare, farmacologia

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Flavia Franconi	PO	franconi@uniss.it
Ilaria Campesi	BC	ilacampesi79@yahoo.it

Non Aderenti INBB

Addis Roberta	BC	robby905@libero.it
Occhioni Stefano	DR	a.galistu@inwind.it
Sanna Manuela	BC	m.sanna@yahoo.it
Fois Marco	DR	fois_marco@hotmail.com

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Indirizzo Via Muroni 23 Sassari

Telefono 079228717

Fax 079228715

E-mail franconi@uniss.it

Indirizzo viale S. antonio Osilo (SS)

Telefono 0793441006

Fax 0793441006

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Genova

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

L'Unità di Ricerca INBB di Sassari concentra la propria attività scientifica prevalentemente su 4 linee:

1. Stato redox e antiossidanti naturali e sintetici (estratti di olio extravergine di oliva e taurina)
2. Differenze di genere, nello stato redox e nel destino cellulare, con particolare attenzione alla valutazione del processo autofagico in cellule (endoteliali e muscolari) ottenute da cordone ombelicale di neonati maschi e femmine e organi (cuori, reni e fegati) ottenuti da ratti maschi e femmine .
3. Neonatal programming
4. Effetto dei contraccettivi orali sulle modificazioni epigenetiche e sull'espressione dei recettori degli estrogeni nei macrofagi in vitro

Ha esperienza sia nel campo della farmacologia, in particolare in farmacologia cardiovascolare e di farmacologia di genere, sia in biochimica clinica. E' anche caratterizzato da esperienze nel settore preclinico e clinico. Negli ultimi tempi il gruppo si propone di valutare i cambiamenti indotti dal genere del sistema redox cellulare, il cui controllo ha dimostrato di essere genere specifico ed estrogeno-dipendente. La metilazione del DNA svolge un ruolo speciale nell'epigenetica ed è anche sotto il controllo, almeno in parte degli estrogeni ed il nostro gruppo si propone di analizzare la metilazione del DNA in sangue intero di soggetti.

Risultati ottenuti

Stress ossidativo e differenze di genere

L'influenza del genere sullo stress ossidativo è stata studiata sulle VSMC isolate dall' aorta di ottenuta animali maschi e femmine. Le cellule femminili producono meno ROS ed hanno maggiori difese sia in condizioni basali che dopo esposizione a UVB in confronto alle cellule maschili.

Inoltre le cellule maschili vanno maggiormente incontro ad apoptosi, mentre quelle femminili vanno maggiormente incontro a senescenza. Queste differenze sembrano dipendere da una maggiore anoikis osservata nelle cellule femminili forse sostenuta dalle differenze presenti a livello dell'actina.

Effetto dei contraccettivi orali sulle modificazioni epigenetiche e sull'espressione dei recettori degli estrogeni nei macrofagi in vitro.

Nelle donne sane l'uso di contraccettivi orali (CO) è incoraggiato durante gli studi clinici. Abbiamo evidenziato che contraccettivi orali combinati con o senza progestinico androgenico influenzano alcuni parametri plasmatici tra cui volume corpuscolare medio, ematocrito, linfociti, glicemia a digiuno, e le HDL. La metilazione del DNA, i parametri di

disfunzione endoteliale, l'omocisteina, e la cisteina sono più bassi in entrambi i tipi di CO rispetto ai controlli. Il TNF- α è rilasciato maggiormente dai macrofagi derivati da monociti (MDM) isolati da donne trattate con CO così come livelli dei recettori per gli estrogeni e il loro stato di attivazione. Queste variazioni indotte dai CO in base alla loro formulazione rischia di influenzare le risposte farmacologiche. Pertanto si consiglia di raccomandare l'uso di un solo tipo di CO in ogni singola sperimentazione clinica.

Differenze di genere nel processo autofagico

Sono stati studiati alcuni marker di autofagia (Beclin-1, LC3-I e LC3-II) e dei lisosomi (LAMP-1) sui cuori, fegati e reni ottenuti da ratti maschi e femmine e l'espressione di mTOR (checkpoint nel processo autofagico), nonché la perossidazione lipidica e l'ossidazione delle proteine. Nel cuore, beclin-1, LC3-II/LC3-I and mTOR, e i gruppi carbonilici sono più elevate nei maschi che nelle femmine, suggerendo una maggiore autofagia basale nei cuori dei ratti maschi. Nel fegato, LAMP-1 è più espresso nei maschi che nelle femmine, indicando un maggior numero di lisosomi, mentre nessuna differenza a tale riguardo è stata osservata nei fegati e nei reni. Infine nei reni è stata riscontrata una differenza nei livelli di perossidazione lipidica che è risultata maggiore nei maschi. Questi dati indicano che il processo autofagico basale è sia genere che organo-specifico.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

- 1: Franconi F, Carru C, Spoletini I, Malorni W, Vella S, Mercurio G, Deidda M, Rosano G. A GENS-based approach to cardiovascular pharmacology: impact on metabolism, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Ther Deliv.* 2011 Nov;2(11):1437-53. Review
- 2: Campesi I, Galistu A, Carru C, Franconi F, Fois M, Zinellu A. Glutamyl cycle in the rat liver appears to be sex-gender specific. *Exp Toxicol Pathol.* 2012 Jun 27.
- 3: Campesi I, Sanna M, Zinellu A, Carru C, Rubattu L, Bulzomi P, Seghieri G, Tonolo G, Palermo M, Rosano G, Marino M, Franconi F. Oral contraceptives modify DNA methylation and monocyte-derived macrophage function. *Biol Sex Differ.* 2012 Jan 27;3:4.
- 4: Franconi F, Campesi I, Occhioni S, Tonolo G. Sex-gender differences in diabetes vascular complications and treatment. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2012 Jun;12(2):179-96.
- 5: Colasanti T, Maselli A, Conti F, Sanchez M, Alessandri C, Barbati C, Vacirca D, Tinari A, Chiarotti F, Giovannetti A, Franconi F, Valesini G, Malorni W, Pierdominici M, Ortona E. Autoantibodies to estrogen receptor α interfere with T lymphocyte homeostasis and are associated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012 Mar;64(3):778-87.
- 6: Zinellu A, Sotgia S, Campesi I, Franconi F, Deiana L, Carru C. Measurement of carnosine, homocarnosine and anserine by FASI capillary electrophoresis UV detection: applications on biological samples. *Talanta.* 2011 May 15;84(3):931-5.
- 7: Franconi F, Carru C, Malorni W, Vella S, Mercurio G. The effect of sex/gender on cardiovascular pharmacology. *Curr Pharm Des.* 2011;17(11):1095-107.
- 8: Marino M, Masella R, Bulzomi P, Campesi I, Malorni W, Franconi F. Nutrition and human health from a sex-gender perspective. *Mol Aspects Med.* 2011 Feb;32(1):1-70.
- 9: Straface E, Lista P, Gambardella L, Franconi F, Malorni W. Gender-specific features of plasmatic and circulating cell alterations as risk factors in cardiovascular disease. *Fundam Clin Pharmacol.* 2010 Dec;24(6):665-74.

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

L'obiettivo dell'Unità di ricerca sarà quello di continuare ad analizzare le differenze esistenti tra i due sessi al fine di migliorare la salute in particolare ci concentreremo sul diabete di tipo 2 e su altre malattie cardiovascolari concentrandosi sul destino cellulare e l'epigenetica dei recettori degli estrogeni e degli altri ormoni sessuali.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

Regitz-Zagrosek V Charité Berlino, Germany
Costanza Emanuelli, Università di Bristol

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

Cappe a flusso laminare
Incubatori a CO₂
Apparecchi per western blot
Microscopio a fluorescenza
Lettore di piastre ELISA
Real time PCR
Chemidoc

PAROLE CHIAVE

Differenze di genere, stress ossidativo, epigenetica, fattori di rischio, autofagia

UNITA' DI RICERCA INBB
Catania

RESPONSABILE SCIENTIFICO

GIUFFRIDA STELLA ANNA MARIA

LINEE DI RICERCA

Studi genetico-molecolari di recettori per neurotrasmettitori (recettori ionotropici e metabotropici per il glutammato) e regolazione della loro espressione in vitro (colture neuronali ed astrogliali) ed in vivo.

Ruolo dei geni della risposta primaria nel processo della morte cellulare programmata neuronale

Regolazione dell'espressione genica da parte di fattori di controllo della proliferazione cellulare in colture di astrociti e neuroni e ruolo di alcuni protooncogeni rapidamente indotti dopo attivazione recettoriale.

- Studio dei meccanismi molecolari alla base del processo di invecchiamento nel sistema nervoso centrale e in colture cellulari neuronali e/o astrogliali in condizioni di stress ossidativo:

- Individuazione e isolamento di geni la cui espressione è modificata significativamente, tramite l'applicazione della tecnica innovativa del "mRNA differential display".

- Studi sulle interazioni tra stato redox e regolazione dell'espressione di geni correlati con meccanismi di protezione cellulare.

- Studio dell'espressione di singole subunità nucleari e/o mitocondriali degli enzimi della catena respiratoria mitocondriale, nonché di specifici fattori di regolazione trascrizionale e post trascrizionale.

- Studio dell'attività e dell'espressione degli enzimi che partecipano alle difese antiossidanti cellulari: Se- e non-Se-glutazione perossidasi, glutazione reductasi, catalasi, Mn-SOD e Cu/Zn-SOD.

- Dosaggio dell'attività e dell'integrità della PARP (poli-ADP-ribosio polimerasi) e del suo ruolo nella protezione dalla morte cellulare programmata (apoptosi) o dalla necrosi.

- Studio della attivazione della via di trasduzione del segnale JAK/STAT in colture primarie astrogliali di ratto in risposta a citochine (IFN-gamma) e tossine batteriche (LPS) ed espressione della forma inducibile della NOS (iNOS).

Ruolo delle heat-shock proteins (HSPs) nell'invecchiamento e nei processi neurodegenerativi

- Clonaggio genico ed analisi dell'espressione di proteine delle gap junctions (connesine) nel sistema nervoso dei roditori e dell'uomo.

Titolo

Basi molecolari dei processi neurodegenerativi e dell'invecchiamento

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Anna Maria Giuffrida Stella	PO	amgsbioc@unict.it
Roberto Avola	PO	ravola@unict.it
Vittorio Calabrese	PA	calabres@unict.it
Daniele Filippo Condorelli	PO	condorda@unict.it
Paola Dell'Albani	(RU - CNR)	dealpa@area.ct.cnr.it
Vincenzo Giuseppe Nicoletti	PA	nicovigi@unict.it

Non aderenti INBB

Di Stefano Donatella	DR	distefanodonatella@virgilio.it
Sonia Grasso	DR	gsoniat@inwind.it
Manuela Pennisi	DR	manuelapennisi@libero.it
Giuseppe Caruso	DR	g.caruso@ymail.com,
Gabriele Bonaventura	DR	gabriele.bonaventura@gmail.com
Malfa Giuseppe	DR	etnaroots@virgilio.it
Lucia Gravina	DR	lucia.gravina@libero.it,
Eugenia Ranno	DR	gearanno@yahoo.it
Vincenza Barresi	PO	barregi@unict.it
Angela Trovato	RU	trovato@unict.it
Vittoria Spina-Purrello	RU	spinavitt@unict.it
Agata Copani	PA	acopani@katamail.com
Maria Vincenza Catania	(RU - CNR)	mcatania@area.ct.cnr.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Dipartimento di Scienze Chimiche, Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare

Università degli Studi di Catania

Indirizzo Via Andrea Doria, 6 – 95125 Catania

Telefono 0957384074

Fax 095336990.

E-mail amgsbioc@mbox.unict.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Catania

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

- regolazione dell'espressione genica di enzimi della catena respiratoria mitocondriale in patologie neurodegenerative e durante l'invecchiamento cerebrale; effetti dello stress ossidativo in vivo ed in vitro.
- ruolo protettivo delle stress protein (HSPs) nella neurotossicità .
- ruolo dell'ossido nitrico di origine gliale nella patogenesi della morte neuronale.
- ruolo della via di trasduzione del segnale JAK/STAT nell'espressione della iNOS.
- relazione tra la cNOS negli astrociti reattivi e il potenziamento della tossicità da attivazione dei recettori metabotropici del gruppo I in colture neuronali in presenza di glia.
- ruolo delle connessine nella patogenesi di diversi disordini neurodegenerativi.
- regolazione dell'espressione genica da parte di fattori di controllo della proliferazione cellulare in colture di astrociti e neuroni e ruolo di alcuni protooncogeni rapidamente indotti dopo attivazione recettoriale.

Risultati ottenuti

Durante i processi di invecchiamento è stato messo in evidenza un aumento della espressione delle HSP70, HSP32 (emeossigenasi) e delle HSP60 in diverse aree cerebrali di ratto ed una diminuzione del contenuto in Glutazione ridotto (GSH) e un aumento del Glutazione ossidato (GS-SG). Pertanto lo stato redox del glutatione sembra avere un ruolo importante nella modulazione dell'espressione genica delle HSPs.

Dopo induzione della NO sintasi in colture astrogliali mediante trattamento con LPS ed INFgamma è stato osservato: un incremento dell'espressione di enzimi della catena respiratoria mitocondriale (citocromo c ossidasi, ATP sintasi) sia a carico delle subunità proteiche che degli mRNA corrispondenti.

un incremento dell'espressione delle HSP70 e delle HSP32 (emeossigenasi).

L'attivazione dei recettori mGlu del gruppo I potenzia la tossicità da NMDA nei granuli cerebellari in presenza di glia, che rilascia uno o più fattori tossici, escludendo che la NOS costitutiva espressa negli astrociti contribuisca ai fenomeni di eccitotossicità.

Una rapida attivazione della proteina STAT1 e correlazione temporale della fosforilazione delle proteine JAK2 e STAT1 e con la trascrizione del mRNA per l'IRF1 e per la iNOS, osservazione confermata tramite un inibitore specifico della fosforilazione di JAK2 in colture primarie astrogliali trattate con IFNgamma.

Per quanto riguarda l'espressione delle connessine è stata studiata la distribuzione del mRNA della connessina CX36 in aree selezionate del Sistema Nervoso Centrale umano: l'espressione più alta è stata riscontrata nell'oliva inferiore, dimostrando che l'espressione della CX36 persiste nell'adulto in neuroni specializzati.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

- 1) Bronzi D, Bramanti V, Tomassoni D, Laureanti F, Grasso S, Li Volsi G, Avola R. Neural markers expression in rat bone marrow mesenchymal stem cell cultures treated with neurosteroids. *Neurochem Res.* 2010 Dec;35(12):2154-60.
- 2) Calabrese V, Cornelius C, Mancuso C, Lentile R, Stella AM, Butterfield DA. Redox homeostasis and cellular stress response in aging and neurodegeneration. *Methods Mol Biol.* 2010;610:285-308.
- 3) Di Paola R, Impellizzeri D, Salinaro AT, Mazzon E, Bellia F, Cavallaro M, Cornelius C, Vecchio G, Calabrese V, Rizzarelli E, Cuzzocrea S. Administration of carnosine in the treatment of acute spinal cord injury. *Biochem Pharmacol.* 2011 Nov 15;82(10):1478-89..
- 4) Bellia F, Vecchio G, Cuzzocrea S, Calabrese V, Rizzarelli E. Neuroprotective features of carnosine in oxidative driven diseases. *Mol Aspects Med.* 2011 Aug;32(4-6):258-66..
- 5) Fortuna CG, Barresi V, Bonaccorso C, Consiglio G, Failla S, Trovato-Salinaro A, Musumarra G. Design, synthesis and in vitro antitumour activity of new heteroaryl ethylenes. *Eur J Med Chem.* 2012 Jan;47(1):221-7. Epub 2011 Nov 11.
- 6) Castorina S, Barresi V, Luca T, Privitera G, Musso N, Capizzi C, Condorelli DF. Recent advances in molecular diagnostics of colorectal cancer by genomic arrays: proposal for a procedural shift in biological sampling and pathological report. *Ital J Anat Embryol.* 2010;115(1-2):39-45..
- 7) Spina-Purrello V, Giliberto S, Barresi V, Nicoletti VG, Giuffrida Stella AM, Rizzarelli E. Modulation of PARP-1 and PARP-2 expression by L-carnosine and trehalose after LPS and INFγ-induced oxidative stress. *Neurochem Res.* 2010 Dec;35(12):2144-53. Epub 2010 Oct 30.
- 8) D'Antoni S, Zambusi L, Codazzi F, Zacchetti D, Grohovaz F, Provini L, Catania MV, Morara S. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) stimulates purkinje cell dendrite growth in culture. *Neurochem Res.* 2010 Dec;35(12):2135-43.
- 9) Caraci F, Battaglia G, Sortino MA, Spampinato S, Molinaro G, Copani A, Nicoletti F, Bruno V. Metabotropic glutamate receptors in neurodegeneration/neuroprotection: Still a hot topic? *Neurochem Int.* 2012 Jan 25. [Epub ahead of print]

10) Calafiore M, Copani A, Deng W. DNA polymerase- β mediates the neurogenic effect of β -amyloid protein in cultured subventricular zone neurospheres. *J Neurosci Res*. 2012 Mar;90(3):559-67. doi: 10.1002/jnr.22780. Epub 2011 Nov 4

11) Caraci F, Molinaro G, Battaglia G, Giuffrida ML, Riozzi B, Traficante A, Bruno V, Cannella M, Merlo S, Wang X, Heinz BA, Nisenbaum ES, Britton TC, Drago F, Sortino MA, Copani A, Nicoletti F. Targeting group II metabotropic glutamate (mGlu) receptors for the treatment of psychosis associated with Alzheimer's disease: selective activation of mGlu2 receptors amplifies beta-amyloid toxicity in cultured neurons, whereas dual activation of mGlu2 and mGlu3 receptors is neuroprotective. *Mol Pharmacol*. 2011 Mar;79(3):618-26.

12) Diego La Mendola, Antonio Magri, Anna Maria Santoro, Vincenzo G. Nicoletti, Enrico Rizzarelli. *Copper(II) interaction with peptide fragments of histidineproline-rich glycoprotein: Speciation, stability and binding details*. *Journal of Inorganic Biochemistry* 111 (2012) 5969.

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Approfondire e ampliare gli studi durante l'invecchiamento e in diversi processi neurodegenerativi sulle modificazioni dell'espressione:

- dei geni nucleari e mitocondriali che codificano per proteine della catena respiratoria mitocondriale;
- delle diverse proteine da stress (Heat-Shock Proteins) e in particolare delle HSP70, HPS32, HPS60;
- della Poli-ADP-ribosio polimerasi (PARP);
- delle connesine;

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

- Prof. Jean De Vellis, UCLA Mental Retardation Res. Center, Los Angeles, California (USA)
- Prof. Regino Perez Polo, Galveston Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Texas Medical Branch, USA
- Prof. Alan Butterfield, Sanders-Brown Center on Aging,, University of Kentucky

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

- Apparecchiature per Southern, Northern, Western blot
- PCR quantitativa in fluorescenza
- Spettrofotometri e spettrofluorimetri
- Microscopio a fluorescenza
- Microscopio confocale
- HPLC - MS

PAROLE CHIAVE

HSPs

PARP

NOS

CsSR (Calcium sensing receptor)

Beta amiloid

UNITA' DI RICERCA INBB
Catania

RESPONSABILE SCIENTIFICO

GUCCIONE SALVATORE

LINEA DI RICERCA

Biomolecole

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Non Aderenti INBB

Basile Livia	A	liviabasile82@gmail.com
Pappalardo Morena	A	morena.pappalardo@gmail.com
Milardi Danilo	A	dmilardi@unict.it
Pappalardo Matteo	BC	mpappala@unict.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Indirizzo Dipartimento di Scienze del Farmaco-Università degli Studi di Catania-V.le A. Doria 6, 95125 Catania;
ETNALEAD s.r.l. via S. Nullo 5i, 95123 Catania.

Telefono 095-738-4020

Fax 095-222239

E-mail guccione@unict.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Catania

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

L'attività di ricerca del gruppo riguarda la progettazione e sintesi di nuove molecole biologicamente attive integrando metodologie sperimentali e computazionali ("in silico"). Dette metodologie vengono anche *ad hoc* opportunamente sviluppate o implementate. L'attività di progettazione parte da un preciso contesto biochimico e farmacologico. Attualmente le linee di ricerca di maggior interesse riguardano i seguenti settori:

- Ligandi dei recettori serotoninergici 5HT_{1A} e 5-HT7.
- Antagonisti del recettore H4 (istamina) nell'ambito della COST action BM0806 MC & WG1/4.
- MAO-A e -B, COX-2, Metallo Proteasi inibitori.
- Multi-target drugs ("drug repositioning"). Poter disporre di farmaci ad attività multifattoriale o poter utilizzare a scopo terapeutico possibili attività *off target* di molecole note offre numerosi vantaggi rispetto alla semplice combinazione di più farmaci.
- Emeossigenase- 1 e -2 Inibitori.
- Interazioni Proteina-Proteina che coinvolgono le due isoforme dell' Emeossigenasi (Emeossigenasi-1 e -2).

Risultati ottenuti

Sono state progettate e sintetizzate o "riposizionate" molecole anche di nuova tipologia strutturale dotate di interessante profilo farmacologico sia nel campo dei ligandi recettoriali che degli inibitori enzimatici.

Nel campo delle interazioni Proteina-Proteina. Proteina è stata caratterizzata e sperimentalmente "provata" mediante Two Hybrid System l' interazione tra le isoforme dell' Emeossigenasi e l' Adiponectina. I risultati ottenuti possono rappresentare un interessante punto di partenza nella terapia del diabete.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

- 1) Luis Berrade, Bárbara Aisa, María J. Ramirez, Silvia Galiano, Salvatore Guccione, Lise Román Moltzau, Finn Olav Levy, Ferdinando Nicoletti, Giuseppe Battaglia, Gemma Molinaro, Ignacio Aldana, Antonio Monge, and Silvia Perez-Silanes.
Novel Benzo[b]thiophene Derivatives as New Potential Antidepressants with Rapid Onset of Action.
J. Med. Chem., **54**, 2011, 3086–3090.
- 2) Maria Angela Castriciano, Andrea Romeo, Nicola Angelini, Norberto Micali, Salvatore Guccione, Luigi Monsù Scolaro.
Spectroscopic Investigation and Molecular Modeling on Porphyrin/PAMAM Supramolecular Adduct.
Photochemistry and Photobiology. **87**, 2, 292–301, 2011.

- 3) B.Maggio ,D.Raffa , M.V.Raimondi,F.Plescica ,M.L.Trincavelli,C.Martini ,F.Meneghetti, L.Basile ,S.Guccione ,G.Daidone
Synthesis, benzodiazepine receptor binding and molecular modelling of isochromeno[4,3-c]pyrazol-5(1H)-one derivatives. Eur. J. Med. Chem. 54 (2012), 709-720.
- 4) Livia Basile , Susana Álvarez , Almudena Blanco , Andrea Santagati , Giuseppe Granada , Patrizia Di Pietro , Salvatore Guccione , Ma Ángeles Muñoz-Fernández
Sulfonilamidothiopyrimidone and thiopyrimidone derivatives as selective COX-2 inhibitors: Synthesis, biological evaluation, and docking studies. Eur. J. Med. Chem. 57 (2012) 149-161
- 5) Valeria Sorrenti, Salvatore Guccione, Claudia Di Giacomo, Maria N. Modica, Valeria Pittalà, Rosaria Acquaviva, Livia Basile, Morena Pappalardo and Loredana Salerno.
Evaluation of Imidazole-Based Compounds as Heme Oxygenase-1 Inhibitors
Chemical Biology & Drug Design. Article first published online : 9 OCT 2012, DOI: 10.1111/cbdd.12015

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Le prospettive, certamente di interesse, considerata l'importanza dei targets studiati riguardano la sintesi o il "database retrieval" (screening virtuale) di nuove molecole con migliore profilo farmacologico comprensivo di proprietà ADME (Administration, Distribution, Metabolism, Excretion) ed il loro eventuale brevetto.

Di notevole potenzialità lo studio sull'emeossigenasi-1 e -2 con l'obiettivo di estendere la mappatura del network di interazioni ("enzima multitasking") si da selezionare e sintetizzare le sequenze responsabili per poterle sintetizzare, saggiare ed eventualmente "convertire" in strutture pseudo-peptidiche.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

1. Prof. Salvatore Lepore, University of South Florida, Department of Chemistry and Biochemistry, 33431 Boca Raton, Florida, US Department of Chemistry, Florida Atlantic University, Boca Raton, Florida 33431.
2. Prof. Rona R. Ramsay, Biomolecular Sciences Building, University of St Andrews, U.K..
3. Dr. Anwar Rayan, Drug Discovery Informatics Lab.- QRC - Qasemi Research Center- Al-Qasemi College, P.O.B. 124, Baka EL-Garbiah 30100 (Israel).

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

PC ad alte prestazioni; softwares di modellistica molecolare.

PAROLE CHIAVE

Progettazione del Farmaco; Ligandi Recettoriali; Inibitori Enzimatici; Interazioni Proteina-Proteina (PPI); Metodi *in silico*.

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

RESPONSABILE SCIENTIFICO

IOTTI STEFANO

LINEA DI RICERCA

Omeostasi del magnesio

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Iotti Stefano	PA	stefano.iotti@unibo.it
Farruggia Giovanna	RU	giovanna.farruggia@unibo.it
Malucelli Emil	RU	emil.malucelli@unibo.it

Non Aderenti INBB

Cappadone Concettina	RU	concettina.cappadone@unibo.it
Merolle Lucia	DR	lucia.merolle@studio.unibo.it
Sargenti Azzurra	A	Rise87@libero.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie

Via Massarenti 19, 40138 Bologna

Telefono 051 42967048

Fax 051 305993

Oppure

Via S. Donato 19/2, 40127 Bologna

Telefono 051 2095625

Fax 051 2095627

E-mail stefano.iotti@unibo.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Bologna

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi: studio dell'omeostasi del Mg, in vivo utilizzando la spettroscopia di risonanza magnetica (MRS) e in vitro con tecniche fluorimetriche, citofluorimetriche, di microscopia confocale e microscopia a raggi X (XRM).

Risultati ottenuti: 1) formulazione di modelli chimici per la ridefinizione delle costanti di complessazione dei principali metaboliti fosforilati con gli ioni metallici citosolici e in particolare in relazione alla [Mg] citosolico misurate in vivo con 31P-MRS;

2) ideazione e realizzazione di approcci matematici quantitativi per la valutazione termodinamica dei tessuti in vivo;

3) sviluppo di metodi per la quantificazione assoluta dei principali metaboliti cerebrali rilevabili con la 1H-MRS, per ampliarne le applicazioni diagnostiche;

4) sviluppo di nuove configurazioni di bobine di superficie a radiofrequenza per apparecchiatura di MR con migliorata sensibilità e selettività spaziale;

5) sviluppo di una classe di sensori fluorescenti otterderivati da un diaza-18-crown-6 coniugato a due 8-idrossichinoline (DCHQ), che presentano diversi sostituenti in 5', in particolare, DCHQ1 (sostituente:H) e DCHQ5 (fenile) mostrano caratteristiche interessanti, essendo ben tollerate dalle cellule, in grado di determinare il Mg totale intracellulare e di monitorarne i rapidi transienti in risposta a stimoli mitocondriali. Queste sonde sono state anche efficacemente applicate per misurare variazioni del Mg intracellulare durante l'apoptosi;

6) utilizzo XRM, ad elevata risoluzione spaziale, per la determinazione della distribuzione e dello stato di valenza del Mg intracellulare in linee cellulari tumorali sensibili e resistenti a farmaci chemioterapici;

7) sviluppo di metodiche per l'analisi d'immagini acquisite con tecniche diverse quali X-Ray Fluorescence Microscopy, XRM e Atomic Force Microscopy, utilizzate per la prima volta in combinazione, per calcolare contenuto e distribuzione di elementi a basso peso atomico come C, Mg, O, N, Na, in diverse linee cellulari.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

Publicazioni con affiliazioni al consorzio:

- 1) Farruggia G., Iotti S., Lombardo M., Marraccini C., Petruzzello D., Prodi L., Sgarzi M., Trombini C., Zaccheroni N., Microwave Assisted Synthesis of a Small Library of Substituted N,N'-Bis((8-hydroxy-7-quinolinyl)methyl)-1,10-diaza-18-crown-6 Ethers. *J Org Chem.* 75 (18) , 6275 – 6278, 2010.
- 2) Trapani V., Farruggia G., Marraccini C., Iotti S., Cittadini A., Wolf F I. Intracellular magnesium detection: imaging a brighter future. *Analyst.*, 135(8), 1855 – 1866, 2010.

- 3) Iotti S, Borsari M, Bendahan D. Oscillations in energy metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 1797(8):1353-61,2010.
- 4) Marverti G., Ligabue A., Montanari M., Guerrieri D., Cusumano M., Di Pietro M.L., Troiano L., Di Vono E., Iotti S., Farruggia G., Wolf F.I., Monti M.G., Frassinetti C. Characterization of the cell growth inhibitory effects of a novel DNA-intercalating bipyridyl-thiourea-Pt(II) complex in cisplatin-sensitive and-resistant human ovarian cancer cells. *Invest New Drugs*, 29(1), 73-86, 2011.
- 5) Lagomarsino S., Iotti S., Farruggia G., Cedola A., Trapani V., Fratini M., Bukreeva I., Notargiacomo A., Mastrototaro L., Marraccini C., Sorrentino A., McNulty I., Vogt S., Legnini D., Kim S., Giagnoncelli A. Maier J.A.M, Wolf. F.I. Intracellular concentration map of magnesium in whole cells by combined use of X-ray fluorescence microscopy and atomic force microscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 66 (11–12), 834–840, 2011.
- 6) Malucelli E., Iotti S., Manners D.N., Testa C., Martinuzzi A., Barbiroli B., Lodi R. The role of pH on the thermodynamics and kinetics of muscle biochemistry: an in vivo study by (31)P-MRS in patients with myophosphorylase deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1807(9), 1244-1249, 2011.
- 7) Lodi R, Tonon C, Valentino ML, Manners D, Testa C, Malucelli E, La Morgia C, Barboni P, Carbonelli M, Schimpf S, Wissinger B, Zeviani M, Baruzzi A, Liguori R, Barbiroli B, Carelli V. Defective mitochondrial adenosine triphosphate production in skeletal muscle from patients with dominant optic atrophy due to OPA1 mutations. *Archives of Neurology* 68(1):67-73, 2011
- 8) Marraccini C., Farruggia G., Lombardo M., Prodi L., Sgarzi M., Trapani V., Trombini C., Zaccheroni N., Wolf F.I., Iotti S. Diaza-18-crown-6 hydroxyquinoline derivatives as flexible tools for the assessment and imaging of total intracellular magnesium. *Chemical Science*, 3, 727-734, 2012.
- 9) Rizzo G, Manners D, Vetrugno R, Tonon C, Malucelli E, Plazzi G, Marconi S, Pizza F, Testa C, Provini F, Montagna P, Lodi R. Combined brain voxel-based morphometry and diffusion tensor imaging study in idiopathic Restless Legs Syndrome patients. *European Journal of Neurology* 19(7):1045-9, 2012
- 10) Sabatini A, Vacca A, Iotti S. . Balanced biochemical reactions: a new approach to unify chemical and biochemical thermodynamics. *PLoS One*, 7(1):e29529, 2012
- 11) Cappadone C., Merolle L., Marraccini C., Farruggia G. , Sargenti A. , Locatelli A., Morigi R., Iotti S. Intracellular magnesium content decreases during mitochondria-mediated apoptosis induced by a new indole-derivative in human colon cancer cells . *Magnesium Research* 2012 in press

Pubblicazioni senza affiliazione al consorzio:

- 12) Andreani A., Granaiola M., Locatelli A., Morigi R., Rambaldi M., Varoli L., Calonghi N., Cappadone C., Farruggia G., Stefanelli C., Masotti L., Nguyen T.L., Hamel E., Shoemaker R.H. Substituted 3-(5-Imidazo[2,1-b]thiazolylmethylene)-2-indolinones and Analogues: Synthesis, Cytotoxic Activity, and Study of the Mechanism of Action (1). *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(5), 2078-88, 2012.

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Sviluppo di sonde fluorescenti per il Mg con localizzazione specifica in diversi compartimenti cellulari, in particolare sonde localizzabili nel mitocondrio e nella membrana plasmatica.

Valutazione del coinvolgimento del Mg nella regolazione dei diversi pathways apoptotici e nel differenziamento cellulare

Ampliamento dello studio delle applicazioni della microscopia a raggi X alla determinazione della localizzazione e dello stato di valenza di diversi elementi intracellulari, valutando sia altri cationi ma anche altri elementi costitutivi della matrice organica.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

- 1) Collaborazione con il Dipartimento di Chimica dell'Università della Corea, per lo sviluppo di chemosensori fluorescenti con “high two-photon cross section” in grado di rilevare ioni Mg in cellule viventi.
- 2) Collaborazione con “Centre de Résonance Magnétique Biologique et Médicale” CNRS Marsiglia, per lo studio della bioenergetica e termodinamica nei sistemi viventi, con particolare attenzione allo studio della correlazione tra termodinamica e Mg.
- 3) Collaborazione con il centro di ricerca FMRIB dell'università di Oxford (centro specializzato in algoritmi di registrazione e “multimodal fusion” di immagini cerebrali di Risonanza Magnetica), per lo sviluppo, implementazione ed ottimizzazione di algoritmi per l'analisi e l'elaborazione di immagini da applicare nel nostro sistema di “cellular imaging”.

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

Spettrofotometro

Fluorimetro statico

Fluorimetro a conteggio del singolo fotone

Laboratorio attrezzato per la coltura di cellule animali

Microscopio a fluorescenza

Workstation

L'unita' di ricerca ha inoltre accesso a 2 microscopi confocali e 2 citofluorimetri del Centro di Ricerche Biotecnologiche dell'Universita' di Bologna e ad uno spettrometro NMR dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna Policlinico S.Orsola-Malpighi

PAROLE CHIAVE

LS3_1 Morphology and functional imaging of cells;

LS3_3 Cell cycle and division

LS3_4 Apoptosis

LS3_5 Cell differentiation, physiology and dynamics

LS4_5 Metabolism, biological basis of metabolism related disorders;

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

RESPONSABILE SCIENTIFICO

IRACE GAETANO

LINEA DI RICERCA

Folding e misfolding di proteine. Studio dei meccanismi molecolari responsabili della formazione degli aggregati amiloidi e loro patogenicità.

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Gaetano Irace

PO

gaetano.irace@unina2.it

Ivana Sirangelo

RU

ivana.sirangelo@unina2.it

Non Aderenti INBB

Silvia Vilasi

DR

vilasi@fisica.unipg.it

Clara Iannuzzi

DR

clara.iannuzzi@unina2.it

Rosa Maritato

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Dipartimento di Biochimica e Biofisica – II Università degli Studi di Napoli.

Indirizzo via L. De Crecchio 7 - 80138 Napoli

Telefono Fax. 081/5665863

E-mail gaetano.irace@unina2.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Napoli

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

L'allungamento della vita media dell'uomo ha evidenziato una serie di disturbi legati all'età, che pongono nuove sfide per la società. Le malattie neurodegenerative, tra cui il morbo di Alzheimer, Parkinson e sclerosi laterale amiotrofica, sono malattie debilitanti e finora incurabili che richiedono un'intensa attività di ricerca. In queste malattie, "misfolding", aggregazione e precipitazione di proteine sembrano essere direttamente correlate alla neurotossicità. In particolare, le alterazioni fisiologiche sono associate alla formazione di aggregati fibrillari, denominati fibrille amiloidi, che tendono ad accumularsi nello spazio extracellulare o come depositi intracellulari. Le fibrille amiloidi sono caratterizzate dalla presenza di un definito motivo strutturale chiamato β -cross, la cui formazione è indipendente dalla struttura secondaria della proteina. La formazione di fibrille amiloidi da parte di proteine non correlate alle malattie supporta il concetto che l'aggregazione amiloide è una generica proprietà della catena polipeptidica indipendentemente dalla sequenza aminoacidica. La conversione delle proteine globulari in aggregati fibrillari richiede un cambiamento conformazionale che, nella maggior parte dei casi, è facilitato da mutazioni aminoacidiche destabilizzanti lo stato nativo. La formazione di fibrille amiloidi avviene attraverso un processo di polimerizzazione nucleazione-dipendente costituito da due fasi, nucleazione ed estensione. Numerosi studi indicano che la tossicità è legata alle forme prefibrillari piuttosto che alle fibrille mature.

L'Unità di ricerca INBB-Napoli è coinvolta da alcuni anni nello sforzo di comprendere i meccanismi che sono alla base del processo di formazione delle fibre amiloidi. Il gruppo vanta una lunga esperienza nell'espressione e purificazione di proteine, negli studi biofisici e biomolecolari del folding, misfolding ed aggregazione proteica e nell'analisi biochimica delle alterazioni fisiologiche conseguenti all'esposizione di cellule e tessuti agli aggregati amiloidi tossici.

La nostra ricerca si è focalizzata su i seguenti aspetti dell'aggregazione amiloide:

- 1) Caratterizzazione dei meccanismi molecolari che causano la formazione di aggregati fibrillari;
- 2) Delucidazione del rapporto struttura-citotossicità degli aggregati ed effetto di sostanze ad azione antiaggregante sul processo di aggregazione e patogenicità;
- 3) Aspetti biochimici e cellulari della patogenicità degli aggregati amiloidi.

I risultati relativi al primo aspetto della ricerca sono stati condotti sul mutante amiloidogeno dell'apomiglobina ed hanno messo in evidenza che la specie molecolare da cui parte il processo di aggregazione è una conformazione "native-like" con elementi di struttura alfa elicoidale in grado di legare il gruppo prostetico. Questa conformazione, rivelata nei primissimi stadi del processo di aggregazione, è fortemente suscettibile ad aggregare attraverso transizioni conformazionali beta e successiva formazione di fibrille amiloidi.

Per quanto riguarda il secondo aspetto sembra ormai evidente che le specie realmente tossiche sono gli aggregati prefibrillari, mentre le fibrille mature sembrano rappresentare uno stadio finale stabile e non tossico dell'aggregazione.

L'importanza di tale considerazione è evidente; qualunque approccio farmacologico al trattamento delle amiloidosi non deve essere mirato ad inibire la crescita delle fibrille ma piuttosto a evitare la comparsa di monomeri "misfolded" e dei loro oligomeri tossici e/o a potenziare l'efficienza dei meccanismi di difesa contro misfolding e aggregazione. Lo studio dell'effetto di sostanze ad azione antiaggregante si sono concentrati sul trealosio, un disaccaride che sembra avere un effetto protettivo su sistemi cellulari modello, e sull'antibiotico tetraciclina. I risultati ottenuti hanno dimostrato che queste sostanze hanno la capacità di inibire il processo di fibrillizzazione (cioè la formazione delle fibrille mature) ma non l'iniziale processo di aggregazione, mantenendo gli aggregati amiloidi nella forma di oligomeri altamente citotossici.

Infine, per la fase del progetto di ricerca indirizzata allo studio della patogenicità degli aggregati amiloidi, i risultati hanno evidenziato che le cellule esposte agli aggregati tossici subiscono alterazioni biochimiche che portano all'attivazione di specifiche vie di segnalazione e ad un forte stress ossidativo che innescano la morte cellulare per apoptosi.

Per lo svolgimento delle indagini di folding sono state utilizzate tecniche spettroscopiche, quali fluorescenza e dicroismo circolare, mentre per lo studio dell'aggregazione sono state impiegate metodiche di colorazione specifica, microscopia a forza atomica e light scattering statico e dinamico. Gli studi di patogenicità sono stati effettuati su cellule in coltura utilizzando saggi di vitalità cellulare, FACS e marcatori biochimici di apoptosi e ROS.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

1. Infusini G, Iannuzzi C, Vilasi S, Birolo L, Pagnozzi D, Pucci P, Irace G, **Sirangelo I**. (2012) Resolution of the effects induced by W → F substitutions on the conformation and dynamics of the amyloid-forming apomyoglobin mutant W7FW14F. **Eur Biophys J.** **4**: 615-27. (affiliazione INBB)
2. Sorrentino A, Giosafatto CV, **Sirangelo I**, De Simone C, Di Pierro P, Porta R, Mariniello L. (2012) Higher susceptibility to amyloid fibril formation of the recombinant ovine prion protein modified by transglutaminase. **Biochim Biophys Acta.** **1822**: 1509-15. (affiliazione INBB)
3. Ortole MG, Spinozzi F, VILASI S, SIRANGELO I., IRACE G, Shukla A, Narayanan T, Sinibaldi R, Mariani P (2011). Time-resolved small-angle x-ray scattering study of the early stage of amyloid formation of an apomyoglobin mutant. **Physical Review E, Statistical, Nonlinear, And Soft Matter Physics** **84**: 61901-61910, ISSN: 1539-3755
4. VILASI S, SARCINA R, MARITATO R, De Simone A, IRACE G, SIRANGELO I. (2011). Heparin induces harmless fibril formation in amyloidogenic W7FW14F apomyoglobin and amyloid aggregation in wild-type protein in vitro. **PLOS ONE**, vol. 6(7); p. e22076, ISSN: 1932-6203
5. SIRANGELO I., IRACE G (2010). Inhibition of aggregate formation as therapeutic target in protein misfolding diseases: effect of tetracycline and trehalose. **EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC TARGETS**, vol. 14(11); p. 1311-1321, ISSN: 1472-8222
6. VILASI S, SIRANGELO I., IRACE G, Caputo I, Barone M.V, Esposito C, Ragone R (2010). Interaction of 'toxic' and 'immunogenic' A-gliadin peptides with a membrane-mimetic environment. **JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION**, vol. 23; p. 322-328, ISSN: 0952-3499

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

L'attività di ricerca di questa Unità continuerà ad esaminare i meccanismi biochimici e molecolari coinvolti nella tossicità degli aggregati amiloidi. Utilizzando tecniche di proteomica, si vorrà valutare il pannello di espressione proteica in diversi modelli cellulari dopo trattamento con gli aggregati amiloidi o in sistemi cellulari che direttamente esprimono la proteina amiloide. Il riconoscimento e la caratterizzazione delle proteine differenzialmente espresse sono potenzialmente in grado di fornire delle indicazioni sulle vie biochimiche coinvolte nei meccanismi di neurodegenerazione e determinare dei marker biochimici e dei possibili target farmacologici.

Inoltre, si valuterà l'effetto della presenza di superfici sull'aggregazione proteica e sulla citotossicità degli aggregati amiloidi. L'effetto delle superfici sull'aggregazione proteica e sulla tossicità degli aggregati è un tema emergente che sta ricevendo crescente attenzione; infatti, gli studi di aggregazione in vitro devono tener conto dell'effetto delle superfici che caratterizzano l'affollato ambiente in cui le proteine vengono sintetizzate e svolgono le loro funzioni.

Il processo di aggregazione amiloide dei peptidi/proteine modello sarà studiato a livello molecolare in soluzione libera e in presenza di superfici biologiche quali glicosaminoglicani (eparina, destrano) e vescicole di membrane cellulari.

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

1. spettrofotometro Jasco V550;
2. spettrofluorimetro Perkin -Elmer Mod PE LS 55;
3. apparecchio per elettroforesi su gel di poliacrilammide accessoriatto Bio-Rad;
4. FTIR
5. Spettro polarimetro Jasco J-810
6. Calorimetro Setaram
7. FACS

PAROLE CHIAVE

Proteine: folding, misfolding e aggregazione proteica; fibrille amiloidi; patogenicità degli aggregati amiloidi.

UNITA' DI RICERCA INBB
Terni

RESPONSABILE SCIENTIFICO

KENNY JOSÈ MARIA

LINEA DI RICERCA

Nanocompositi a matrice polimerica biodegradabile

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Josè Maria Kenny	PO	jkenny@unipg.it
Armentano Ilaria	BC	ilaria.armentano@unipg.it
Fortunati Elena	BC	elena.fortunati@unipg.it
Mattioli Samantha	BC	samanthamattioli@gmail.com

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Indirizzo: strada di Pentima 4, 05100 Terni

Telefono: +39-0744-492914

Fax: +39-0744-492950

E-mail: jkenny@unipg.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Ingegneria Civile e Ambientale

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

L'attività di ricerca si è svolta avendo come obiettivo principale lo sviluppo di nuovi biomateriali intelligenti dalle proprietà modulabili, che possano direzionare il comportamento delle cellule staminali adulte.

Un elenco dettagliato degli obiettivi è di seguito riportato:

1. Progettazione e sviluppo di superfici ingegnerizzate nanotopografiche, per modulare l'adesione, l'allineamento, l'elongazione e il differenziamento di cellule staminali adulte.
2. Realizzazione di bionanocompositi intelligenti con proprietà elettriche e meccaniche modulabili.
3. Sviluppo di scaffold tridimensionali porosi, basati sui biomateriali nanocompositi sviluppati.
4. Sintesi di nanoparticelle polimeriche e nanogusci costituiti da una parete polimerica biodegradabile e un nucleo metallico/magnetico sensibile a stimoli esterni.
5. Comprensione degli aspetti di base dei meccanismi di interazione cellule staminali/biomateriali, e in particolare analisi dei meccanismi di meccanotrasduzione.

Risultati ottenuti

I risultati ottenuti dall'attività di ricerca durante il triennio 2010-2012 sono i seguenti:

-Ingegnerizzazione di superfici polimeriche che modulano il comportamento delle cellule staminali. Lo studio ha permesso un controllo preciso e dettagliato della topografia superficiale, inducendo la formazione di canali e quadrati di dimensioni variabili, su film di spessori nanometrici e una modulazione della rugosità con formazione di nanostrutture superficiali a geometria variabile.

-Realizzazione di nanocompositi polimerici conduttori, identificando la soglia di percolazione in relazione alla tipologia della nanostruttura selezionata. Un importante risultato è stato la realizzazione di nanocompositi con proprietà di trasporto elettrico grazie all'interazione non covalente di due diverse tipologie di nanostrutture: nanoparticelle d'argento e nanotubi di carbonio.

-Selezione e valutazione dei metodi di processo più indicati per la realizzazione di nanoparticelle e nanogusci polimerici, con una buona riproducibilità e che favoriscono un controllo preciso e dettagliato della dimensione dei diametri.

-Realizzazione di nanocompositi polimerici porosi, con un buon grado di interconnessione e un controllo dettagliato della morfologia e delle proprietà meccaniche.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012 (* affiliazione INBB)

1. A. Bianco, C Del Gaudio, S Baiguera, I. Armentano, C. Bertarelli, M. Dottori, G. Bultrini, A. Lucotti, J.M. Kenny, and M. Folin. Microstructure and cytocompatibility of electrospun nanocomposites based on poly(ϵ -caprolactone) and carbon nanostructures. *Int J Artif Organs* 2010; 33 (5): 271-282. IF: 1.3. (*)
2. I. Armentano, M. Dottori, E. Fortunati, S. Mattioli, J.M. Kenny. Biodegradable Polymer Matrix Nanocomposites For Tissue Engineering: A Review. *Polymer Degradation and Stability* 95 (2010) 2126-2146 IF:2.3. (*)

3. F. D'Angelo, I. Armentano, S. Mattioli, L. Crispoltoni, R. Tiribuzi, GG Cerulli, CA Palmerini, JM Kenny, S Martino and A Orlacchio. Micropatterned hydrogenated amorphous carbon guides mesenchymal stem cells towards neuronal differentiation. *e Cells and Materials Journal* 2010, 20, pp: 231-244. (*)
4. I. Armentano, L. Marinucci, M. Dottori, S. Balloni, E. Fortunati, M. Pennacchi, E. Becchetti, P. Locci, J. M. Kenny. Novel Poly(L-lactide) PLLA/SWNTs Nanocomposite for Biomedical Applications: Material Characterization and Biocompatibility Evaluation. *Novel Poly(L-lactide) PLLA/SWNTs Nanocomposite for Biomedical Applications: Material Characterization and Biocompatibility Evaluation. Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* 22 (2011) 541–556. (*)
5. M. Dottori, I. Armentano, E. Fortunati, J.M. Kenny. Production and properties of solvent-cast poly(ϵ -caprolactone) composites with carbon nanostructures. *Journal of Applied Polymer Science*. (2011) 119(6):3544-3552. IF: 1.2 (*)
6. Fortunati E, D'Angelo F, Martino S, Orlacchio A, Kenny JM, and Armentano I. Carbon nanotubes and silver nanoparticles for multifunctional conductive biopolymer composites. *Carbon*, 49:23709, 2011. (*)
7. S.Martino; F. D'Angelo; I. Armentano, JM Kenny and A. Orlacchio. Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine. *Biotechnology Advances* 30 (2012): 338-351. (*)
8. E. Fortunati, L. Latterini, S. Rinaldi, JM Kenny, I. Armentano. PLGA/Ag nanocomposites: in-vitro degradation study and silver ion release. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 22 (2011): 2735-2744
9. S. Mattioli, JM Kenny and I Armentano. Plasma surface modification of porous PLLA films: analysis of surface properties and in-vitro hydrolytic degradation. *J applied Polymer Science*. Accepted 2012 DOI 10.1002/app.36827
10. F. D'Angelo, I. Armentano, I. Cacciotti, R. Tiribuzi, M. Quattrocchi, C. Del Gaudio, E. Fortunati, E. Saino, A. Caraffa, G. G. Cerulli, L. Visai, J. M. Kenny, M. Sampaolesi, A. Bianco, S. Martino, and A. Orlacchio. Tuning Multi/Pluri-Potent Stem Cell Fate by Electrospun Poly(L-lactic acid)-Calcium-Deficient Hydroxyapatite Nanocomposite Mats *Biomacromolecules*, 2012, 13 (5), pp 1350–1360. DOI:10.1021/bm3000716. (*)
11. N Rescignano, M Amelia, A Credi, JM Kenny and I Armentano Morphological and thermal behaviour of porous biopolymeric nanoparticles. *European Polymer Journal*, Accepted EPJ_EUROPOL-D-11-01115.
12. E. Lizundia, J. R. Sarasua F. D'angelo, S. Martino, A. Orlacchio, J. M Kenny, I. Armentano Biocompatible Poly (L-lactide) / MWCNT nanocomposites: morphological characterization, electrical properties and stem cell interaction. Accepted in *Macromolecular Bioscience* mabi.201200008.

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

- Studio dei meccanismi di base della meccanotrasduzione.
- Sviluppo di nuovi bio-nanocompositi con morfologia controllata utilizzando polimeri biodegradabili sintetici e naturali.
- Sviluppo di modifiche superficiali bioattive allo scopo di favorire l'interazione cellulare con polimeri sintetici.
- Studio dell'internalizzazione da parte di cellule staminali adulte di nanoparticelle polimeriche biodegradabili, analisi del meccanismo di internalizzazione.
- Sviluppo di nuovi materiali antibatterici, in strutture tridimensionali (scaffold) e bidimensionali (film)

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

Mexico, Universidad Nacional Autónoma de México, Prof. Higinio Arzate.
 Spain, CSIC, Madrid, Prof. M. Lopez Manchado and Prof. C. Mijangos
 Svezia, KTH, Prof. Lars Berglund.

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

I diversi laboratori disponibili per la produzione e caratterizzazione dei materiali sono:

- Laboratorio di analisi termica: calorimetro a scansione differenziale (DSC), bilancia termogravimetrica (TGA), analizzatore termomeccanico (TMA), analizzatore del rilassamento vetroso (DMTA), analizzatore della conducibilità termica.
- Laboratorio di caratterizzazione fisico-chimica: spettrofotometro ad infrarosso (FT-IR), spettrofotometro (UV-Vis), angolo di contatto (FTA), analizzatori di impedenza, elettrometro di precisione.
- Laboratorio di deposizione e caratterizzazione di film sottili e nanostrutturati: impianto di deposizione chimica attivato al plasma (PECVD), evaporatore termico, microscopio elettronico a scansione ad emissione di campo (FESEM) con microanalisi (EDS), microscopio a forza atomica (AFM) e dispositivo di nanoindentazione (NI).
- Laboratorio di biomateriali: essiccatore al punto critico (CPD), che permette la disidratazione campioni biologici per la successiva analisi con microscopia elettronica, incubatore, pH-metro e glove box.
- Laboratorio di caratterizzazione meccanica: dinamometro universale per prove di trazione, flessione, tenacità a frattura; analizzatore delle proprietà dinamo-meccaniche (DMA), durometro.
- Laboratorio tecnologico di lavorazione e riciclo di materiali plastici: impianto di microestrusione bi-vite per la filatura, filmatura dei polimeri e stampaggio per iniezione dei polimeri.

PAROLE CHIAVE

- PE5_1 Structural properties of materials; - PE5_3 Surface modification; - PE5_7 Biomaterials synthesis; - PE5_8 Intelligent materials – self assembled materials; - LS3_5 Cell differentiation, physiology and dynamics

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

RESPONSABILE SCIENTIFICO

LAFORGIA VINCENZA

LINEA DI RICERCA

Influenza degli interferenti endocrini (ie) sulle ghiandole endocrine e sul sistema nervoso di organismi bioindicatori.

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INB

Laforgia Vincenza	PO	vincenza.laforgia@unina.it
De Falco Maria	RU	madefalco@unina.it
Valiante Salvatore	RU	valiante@unina.it

Non Aderenti INBB

Capaldo Anna	RU	anna.capaldo@unina.it
Sciarrillo Rosaria	RU	sciarrillo@unisannio.it
Forte Maurizio	DR	maurizio.forte@unina.it
Maddaloni Massimo	DR	massimo.maddaloni@unina.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Dipartimento Scienze Biologiche. Università di Napoli Federico II, Via Mezzocannone 8, 80134, Napoli

Telefono : 0812535170

Fax: 0812535035

E-mail vincenza.laforgia@unina.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Napoli

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

Le principali attività sono incentrate in ambito biologico nello studio degli effetti dei contaminanti ambientali quali distruttori endocrini e droghe su sistemi biologici in vivo ed in vitro. In particolare il gruppo, dopo aver studiato gli effetti di un pesticida, il tiofanato metile sull'asse ipotalamo/ipofisi/ghiandola surrenale e ipotalamo/ipofisi/tiroide attualmente si sta interessando degli effetti degli alchilfenoli, octilfenolo e nonilfenolo, sui tessuti di organismi bioindicatori come il rettile squamato *Podarcis sicula* (la comune lucertola campestre). Sono in corso di studio gli effetti di tali interferenti endocrini sul fegato, encefalo, tiroide e ghiandole surrenali attraverso tecniche immunoistochimiche e biomolecolari (RTPCR, Western blot, ibridazione in situ). Contemporaneamente il gruppo sta studiando gli effetti della cocaina sul sistema nervoso ed endocrino del bioindicatore acquatico *Anguilla anguilla*. Due dottorandi di ricerca stanno svolgendo la loro tesi sperimentale su questi argomenti di ricerca.

In ambito biomedico gli studi del gruppo vertono anche sui meccanismi di regolazione morfo-funzionale della placenta umana nel corso della gestazione e in alcune patologie placentari mediante l'applicazione di tecniche immunoistochimiche.

Risultati ottenuti

I risultati inerenti allo studio dei contaminanti ambientali hanno dimostrato l'esistenza di un effetto tempo- e dose-dipendente inibitorio sull'asse ipotalamo/ipofisi/tiroide e stimolante sull'asse ipotalamo/ipofisi/surrene. Per quanto riguarda gli effetti della cocaina, è stato dimostrato che tale sostanza si bioaccumula nei tessuti periferici dell'anguilla e determina un incremento dei livelli plasmatici di cortisolo e catecolamine. Gli studi sulla placenta umana hanno evidenziato il ruolo dell'apoptosi e di proteine del ciclo cellulare nei diversi trimestri di gestazione e che la deregolazione delle proteine coinvolte in tali pathway determina l'insorgenza di diverse patologie placentari.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

- 1) Agnese M, Valiante S, Angelini F, Laforgia V, Andreuccetti P, Prisco M. (2010) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptor PAC1 in the testis of *Triturus carnifex* and *Podarcis sicula*. Gen Comp Endocrinol., 168(2), 256-61. I.F. 2,7
- 2) Signorile P.G., Baldi F., Bussani R., D'Armiento M., De Falco M., Boccellino M., Quagliuolo L., Baldi A. (2010) New evidence of the presence of endometriosis in the human fetus. Reproductive Biomedicine Online 21 (1): 142-147. I.F. 2.380
- 3) Valiante S., Sellitti A., Laforgia V., De Falco M. (2010) Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polipeptide (PACAP) receptors in peripheral tissues during mouse perinatal development. J. Mol. Neurosci. 42, 3, 304. I.F. 2,7

- 4) Valiante S., Sellitti A., Sciarrillo R., Capaldo A., Gay F., Laforgia V., De Falco M. (2010) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor expression is altered in the brain of *Podarcis sicula* after nonylphenol administration. *J. Mol. Neurosci.* 42, 3, 283. I.F. 2,7
- 5) Valiante S., Prisco M., Crescenzo R., Bianco F., Agnese M., De Falco M., Andreuccetti P., Laforgia V. (2010) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors in diet-induced obese rat adrenal gland. *J. Mol. Neurosci.* 42, 3, 306-307. I.F. 2,7
- 6) De Falco M., De Luca A. (2010) Cell cycle as a target of antineoplastic drugs. *Current Pharmaceutical Design* 16 (12): 1417-1426. I.F. 4.414
- 7) Capriglione T., De Iorio S., Gay F., Capaldo A., Morescalchi M.A., Vaccaro M.C., Laforgia V. (2011) Genotoxic effects of the fungicide thiophanate-methyl on *Podarcis sicula* assessed by micronucleus test, comet assay and chromosome analysis. *Ecotoxicology.* 20 (4), 885-891. I.F. 3,051
- 8) Manente L., Sellitti A., Lucariello A., Laforgia V., De Falco M., De Luca A. (2011) Effects of 4-nonylphenol on the proliferation of AGS gastric cells. *Cell Prolif.* Oct;44(5):477-85. I.F. 2,917
- 9) Del Giudice G., Prisco M., Agnese M., Valiante S., Verderame M., Limatola E., Laforgia V., Andreuccetti P. (2011) Expression of vitellogenin receptor in the ovarian follicles during the reproductive cycle of the spotted ray *Torpedo marmorata* Risso 1880. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.* 1;315(10):585-92. I.F. 1,5 (*)
- 10) De Falco M., Manente L., Lucariello A., Baldi G., Fiore P., Laforgia V., Baldi A., Iannaccone A., De Luca A. (2012) Localization and distribution of wolframin in human tissues. *Front Biosci (Elite Ed).* 1;4:1986-98. I.F. 3,735
- 11) Capaldo A., Gay F., Valiante S., De Falco M., Sciarrillo R., Maddaloni M., Laforgia V. (2012) Endocrine-disrupting effects of nonylphenol in the newt, *Triturus carnifex* (Amphibia, Urodela). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* Mar;155(2):352-8 I.F. 2.325 (*)
- 12) Capaldo, A., Gay, F., Maddaloni, M., Valiante, S., De Falco, M., Lenzi, M. and Laforgia, V. (2011) Presence of Cocaine in the Tissues of the European Eel, *Anguilla anguilla*, Exposed to Environmental Cocaine Concentrations. *Water, Air & Soil Pollution*, 223 (5): 2137-2143. I.F. 1.765

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

L'obiettivo è quello di definire modelli sperimentali animali e di individuare specifici biomarkers per valutare gli effetti degli IE a livello cellulare, tissutale e sistemico. Ci proponiamo di mettere a punto semplici test utilizzando nuovi biomarcatori molecolari da utilizzare programmi mirati di monitoraggio biologico delle alterazioni provocate dagli IE al fine di predire e chiarire il loro effetto sulla salute umana. Poiché gli IE possono agire a livello genomico e non, ci proponiamo di verificare se determinano alterazioni nell'espressione di ben definiti geni bersaglio.

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

PCR

Real time PCR

Sistema di analisi di immagine

Camera sterile per colture cellulari

Microscopio confocale

PAROLE CHIAVE (secondo codici ERC)

Environmental toxicology

Environment and health risks including radiation

Endocrinology

Cell cycle and division

Cell signalling and cellular interactions

UNITA' DI RICERCA INBB
Milano

RESPONSABILE SCIENTIFICO

MAGGI ADRIANA

LINEA DI RICERCA:

Meccanismi di regolazione, metabolismo energetico e riproduzione, estrogeni e cancro, estrogeni e neuroinfiammazione, estrogeni e tossicologia ambientale

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Maggi Adriana PO adriana.maggi@unimi.it

Non Aderenti INBB

Vegeto Elisabetta	PA	elisabetta.vegeto@unimi.it
Ciana Paolo	RU	paolo.ciana@unimi.it
Villa Alessandro	BC	alessandromaria.villa@unimi.it
Della Torre Sara	DR	Sara.dellatorre@unimi.it
Benedusi Valeria	DR	Valeria.benedusi@unimi.it
Meda Clara	PT	Clara.meda@unimi.it
Rebecchi Monica	PT	Monica.rebecchi@unimi.it
Vantaggiato Cristina	PT	Cristina.vantaggiato@unimi.it
Notarantonio Rossana	A	Rossana.notarantonio@unimi.it
Rotondo Isabella	A	Isabella.rotondo@unimi.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Via Balzaretti, 9 - Milano

Telefono +39 0250318375

Fax +39 0250318290

E-mail centro.eccellenza@unimi.it – adriana.maggi@unimi.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Milano

RIASSUNTO DELLA ATTIVITÀ DI RICERCA SVOLTA NEGLI ULTIMI 3 ANNI

Attualmente, la Prof. Maggi dirige un gruppo di circa venti ricercatori e studenti presso il Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari dell'Università di Milano. I suoi interessi di ricerca sono sempre rivolti alla comprensione del ruolo fisiologico degli estrogeni e dei loro recettori in particolare nell'organismo femminile e durante l'invecchiamento.

Con i suoi studi, la professoressa Maggi ha dimostrato il ruolo significativo svolto dagli estrogeni nel controllo di funzioni fisiologiche anche non associate con la riproduzione. Gli studi sull'attività anti-infiammatoria degli estrogeni sono alla base della ipotesi che la suscettibilità della donna in menopausa a malattie quali osteoporosi, arteriosclerosi, diabete sia da ascrivere almeno in parte, al fatto che la ridotta produzione di estrogeni tipica della menopausa, determini un crollo delle difese naturali della donna alla infiammazione. Più recentemente la ricerca svolta si è focalizzata sulle interazione tra sistema riproduttivo e metabolismo energetico con la definizione dei meccanismi molecolari attraverso cui il recettore degli estrogeni alfa agisce nel fegato quale sensore dello stato nutrizionale necessario per il corretto svolgimento del ciclo riproduttivo. Inoltre il recettore degli estrogeni epatico svolge anche un ruolo di regolatore del metabolismo energetico epatico in relazione allo stato riproduttivo nel mammifero. Tali studi sono di rilevanza per la comprensione della aumentata incidenza di dismetabolismo epatico nella donna in seguito a menopausa naturale o chirurgica.

PUBBLICAZIONI RECENTI

- Alessandro Villa, Sara Della Torre, Alessia Stell, Jennifer Cook, Myles Brown and Adriana Maggi A tetradian oscillation of Estrogen Receptor alpha is necessary to prevent liver lipid deposition. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) in press.
- Benedusi V, Meda C, Della Torre S, Monteleone G, Vegeto E, Maggi A. A Lack of Ovarian Function Increases Neuroinflammation in Aged Mice. Endocrinology 2012, 153:2777-88. Epub 2012 Apr
- Goeman F, Manni I, Artuso S, Ramachandran B, Toietta G, Bossi G, Rando G, Cencioni C, Germoni S, Straino S, Capogrossi MC, Bacchetti S, Maggi A, Sacchi A, Ciana P, Piaggio G. Molecular imaging of NF- κ B transcriptional activity maps proliferation sites in live animals. Mol Biol Cell. 2012 Feb 29.

- Della Torre S, Rando G, Meda C, Stell A, Chambon P, Krust A, Ibarra C, Magni P, Ciana P, Maggi A. Amino acid-dependent activation of liver estrogen receptor alpha integrates metabolic and reproductive functions via IGF-1. *Cell Metab.* 2011, 13:205-14.
- Della Torre S, Biserni A, Rando G, Monteleone G, Ciana P, Komm B, Maggi A. The conundrum of estrogen receptor oscillatory activity in the search for an appropriate hormone replacement therapy. *Endocrinology* 2011, 152:2256-65
- Maggi A. Liganded and unliganded activation of estrogen receptor and hormone replacement therapies. *Biochim Biophys Acta.* 2011, 1812:1054-60. Epub 2011 May 14
- Chambliss KL, Wu Q, Oltmann S, Konanah ES, Umetani M, Korach KS, Thomas GD, Mineo C, Yuhanna IS, Kim SH, Madak-Erdogan Z, Maggi A, Dineen SP, Roland CL, Hui DY, Brekken RA, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Shaul PW. Non-nuclear estrogen receptor alpha signaling promotes cardiovascular protection but not uterine or breast cancer growth in mice. *J Clin Invest.* 2010, 120:2319-30.
- Rando G, Horner D, Biserni A, Ramachandran B, Caruso D, Ciana P, Komm B, Maggi A. An innovative method to classify SERMs based on the dynamics of estrogen receptor transcriptional activity in living animals. *Mol Endocrinol.* 2010, 24:735-44. Epub 2010 Mar 2
- Vegeto E, Cuzzocrea S, Crisafulli C, Mazzon E, Sala A, Krust A, Maggi A. Estrogen receptor-alpha as a drug target candidate for preventing lung inflammation. *Endocrinology.* 2010, 151:174-84. Epub 2009 Dec 1.
- Brufani M, Ceccacci F, Filocamo L, Garofalo B, Joudioux R, La Bella A, Leonelli F, Migneco LM, Bettolo RM, Farina PM, Ashcroft GS, Routley C, Hardman M, Meda C, Rando G, Maggi A. Novel locally active estrogens accelerate cutaneous wound healing. A preliminary study. *Mol Pharm.* 2009, 6:543-56.
- Cignarella A, Bolego C, Pelosi V, Meda C, Krust A, Pinna C, Gaion RM, Vegeto E, Maggi A. Distinct roles of estrogen receptor-alpha and beta in the modulation of vascular inducible nitric-oxide synthase in diabetes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009, 328:174-82

BREVETTI ACCORDATI

- Alpha-substituted derivatives of estradiol with wound-healing activity Inventors: Ashcroft G (GB); Brufani M. (It); Ceccacci F. (It); Farina P. (It); Filocamo L. (It); Garofalo B. (It); Joudioux R. (It); Maggi A. (It); Marini Bettolo R. (It); Migneco LM. (It), wo2007014711
- Transgenic Mouse for Screening and for Studies of the Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Ligands Acting on Intracellular Receptors, and Method for the Preparation Thereof. Inventors Ciana P (It); Maggi A.(It) Patent EP 1298988.
- Method of Synthesis of Luciferin an Dehydroluciferin. Inventors: Santaniello O (It), Meroni P.(It), Ciana P. (It), Maggi A. (It) MI 2009A000294.
- Cell Proliferation, and its Use in Pharmaceutical Field. Inventors: Ciana P. (It), Maggi A.(It), Piaggio G.(It), Tiveron. C.(It) MI 2009A002023.
- Transgenic Mouse for Screening and for Studies of the Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Ligands Acting on Oestrogen Receptor and its Intracellular Receptors, and Method for the Preparation Thereof. Inventors: Ciana P. (It); Maggi A.(It). Patent US20030182676.

PROSPETTIVE E OBIETTIVI DI RICERCA NEI PROSSIMI TRE ANNI

Nell'immediato futuro il gruppo si focalizzerà su:

1. Creazione di modelli di animali reporter per lo studio in vivo di fenomeni infiammatori e di stress ossidativo mediante metodologie di imaging non invasivo
2. i meccanismi di controllo del metabolismo energetico esercitato nei mammiferi di sesso femminile da parte degli estrogeni e loro recettori. In particolare il gruppo focalizzerà il proprio interesse sul cross-talk tra fegato e cervello nel controllo del metabolismo lipidico e della assunzione di cibo.
3. Modulazione degli estrogeni della neuroinfiammazione anche in relazione alla progressione di malattie neurodegenerative

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

Consorzio In MIND <http://www.uni-muenster.de/InMind/>

CNRS – Barbara Demeneix,;CEA, Belgium; Bertrand Tavitian; Istituto Cajal, CSIC, Madrid, Spagna – Gabriel Garcia Segura; University of Huston - Jan-Åke Gustafsson; University of Munster - A.H. Jacobs; Privatuniversitat Salisburgo – L.Agner; Istitut d'Investigations Biomediques August Pi Sunyer – Anna Planas; University Antwerpen (Belgio) – Anemie Van der Linder; University of Manchester - K. Herholz – H. Boutin; University of Leuven – K. Van Laere – V. Baekeland; Semmelweis Egyetem – M. Kellermayer; Universitätsklinikum Bonn –Heneka.

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

Laboratorio di biologia molecolare e ingegneria cellulare e animale perfettamente attrezzato Laboratorio d'istologia, completamente attrezzato: 1 bagno stendifette termostato 1 centralina d'inclusione 2 microtomi 1 inclusore automatico

Il centro è inoltre dotato di apparecchiature d'uso routinario, quali: centrifughe da banco, apparati per elettroforesi, power supplies, stereomicroscopi, apparecchiature stereotassiche, computer completi di monitor.

Laboratorio di bio-imaging funzionale, completamente attrezzato: Microscopio ottico a luce invertita, luce visibile e UV, dotato di CCD camera per acquisizione di immagini, con software dedicato e di un sistema d'incubazione che consente l'acquisizione d'immagini da sistemi in vivo. Laboratorio di biochimica per le tecnologie avanzate, completamente attrezzato: 1 spettrometro di massa standard 1 spettrometro di massa ad alta sensibilità Gascromatografi HPLC NMR ad alta risoluzione Strumentazioni per cromatografia ad alta risoluzione Laboratorio di Ingegneria animale e cellulare completamente attrezzato: 4 microscopi ottici a luce trasmessa e fluorescente, di cui 2 dotati di foto/videocamere digitali e software per acquisizione ed elaborazione immagini. 1 microscopio confocale 1 CCD camera per bioimaging 1 Citofluorimetro 2 Versadoc (per acquisizione di gel derivanti da analisi di western, southern, northern blot) 2 Phosphoimager (per l'acquisizione di gel derivanti dall'utilizzo di campioni radio-marcati) 2 Real Time PCR per analisi quantitativa di cDNA 1 Sequenziatore di DNA

PAROLE CHIAVE

LS4 Fisiologia, patofisiologia e endocrinologia/ LS5 Neuroscienze e disordini neurali/ LS1 Biologia molecolare e biochimica

UNITA' DI RICERCA INBB
Milano

RESPONSABILE SCIENTIFICO
MAGNAGHI VALERIO

LINEA DI RICERCA
Neurofisiologia e Medicina Rigenerativa del Sistema Nervoso Periferico

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Magnaghi Valerio RU valerio.magnaghi@unimi.it

Non Aderenti INBB

Mantovani Cristina Maria A (assegnista di ricerca) maria.mantovani@unimi.it

Castelnovo Luca Franco A (assegnista di ricerca) lucastell18@gmail.com

Ballabio Marinella PT marinella.ballabio@unimi.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Indirizzo Dip. Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Univ. degli Studi di Milano, Via G. Balzaretti 9, 20133 Milano

Telefono 02-50318207

Fax 02-50318204

E-mail valerio.magnaghi@unimi.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Milano

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

Gli obiettivi di ricerca perseguiti nel corso degli ultimi anni sono stati i seguenti

1. Studio del ruolo dei neurotrasmettitori e dei neurosteroidi nel *cross-talk* neuroni-glia, con particolare riferimento al ruolo del sistema GABAergico/Glutammato sulle funzioni di neuroni e mielina del sistema nervoso periferico. Tali studi sono stati condotti in modelli di patologia neurodegenerativa periferica, demielinizzazione, dolore neuropatico e in animali *knock-out*.
2. Studio di biomateriali e terapie alternative con cellule staminali adulte, quali *tools* per la rigenerazione dei nervi e il trattamento delle neuropatie periferiche.

Risultati ottenuti

I risultati ottenuti dagli studi sul ruolo di neurosteroidi e neurotrasmettitori nel sistema nervoso periferico hanno permesso di attribuire un nuovo ruolo al sistema GABAergico. Non solo si è chiaramente dimostrato il patrimonio recettoriale e biosintetico del GABA a livello del sistema nervoso periferico, ma si è attribuita la sua presenza soprattutto alla componente gliale, cioè alle cellule di Schwann, cellule fondamentali per i processi rigenerativi dei nervi. L'interessante ipotesi che ne è emersa è che il sistema GABAergico possa partecipare nel processo di proliferazione e mielinizzazione periferico e questo potrebbe rappresentare un nuovo strumento terapeutico per il trattamento delle neuropatie periferiche.

A tal proposito, è altrettanto importante l'uso di biomateriali e di recente anche di cellule staminali (soprattutto da tessuto adiposo adulto) per la rigenerazione dei nervi in seguito a traumi di natura meccanica. I nostri studi si sono concentrati sullo studio di *conduits* a base di polimeri di poliamidoamine che si sono dimostrati ottimi *scaffolds* per la rigenerazione dei nervi.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012 (* affiliazione anche al Consorzio)

1. Magnaghi V., Parducz A., Frasca A., Ballabio M., Procacci P., Racagni G., Bonanno G., Fumagalli F., GABA synthesis in Schwann cells is induced by the neuroactive steroid allopregnanolone. *J. Neurochem.* 112:980-90, 2010. (*)
2. Magnaghi V., Mutti E., Veber D., Faroni A., Pece S., Di Fiore P.P., Scalabrino G., Cobalamin deficiency-induced changes of epidermal growth factor (EGF)-receptor expression and EGF levels in rat spinal cord. *Brain Res.* 1376:23-30, 2011. (*)
3. Magnaghi V., Conte V., Procacci P., Pivato G., Cortese P., Cavalli E., Pajardi G., Ranucci E., Fenili F., Manfredi A., Ferruti P., Biological performance of a novel biodegradable polyamidoamine hydrogel as guide for peripheral nerve regeneration. *J Biomed Mater Res A*, 98:19-30, 2011.
4. Faroni A., Mantovani C., Shawcross S., Motta M., Terenghi G., Magnaghi V. Schwann-like adult stem cells derived from bone marrow and adipose tissue express GABA-B receptors. *J. Neurosci Res.*, 89:1351-62, 2011.

5. De Nuccio C., Bernardo A., De Simone R., Mancuso E., Magnaghi V., Visentin S., Minghetti L. Peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists accelerate oligodendrocyte maturation and influence mitochondrial functions and oscillatory Ca(2+) waves. *J Neuropathol Exp Neurol.* 70:900-912, 2011.
6. De Angelis F., Bernardo A., Magnaghi V., Minghetti L., Tata A.M., Muscarinic receptor subtypes a potential targets to modulate oligodendrocyte progenitor survival, proliferation and differentiation. *Dev. Neurobiol.* 72(5):713-28, 2011. (*)
7. Faroni A., Magnaghi V., The neurosteroid allopregnanolone modulates specific functions in central and peripheral glial cells. *Front. Endocrinol (Lausanne)*, 2:103, 2011.
8. Faroni A., Terenghi G., Magnaghi V., Expression of functional γ -aminobutyric acid type A receptors in Schwann-like adult stem cells *J. Mol. Neurosci.*, 47:619-30, 2012.
9. Perego C., Cairano E.S., Ballabio M., Magnaghi V., Neurosteroid allopregnanolone regulates EAAC1-mediated glutamate uptake and triggers actin changes in Schwann cells. *J Cell Physiol.*, 227:1740-51, 2012.
10. Faroni A, Calabrese F, Riva MA, Terenghi G, Magnaghi V., Baclofen modulates the expression and release of neurotrophins in Schwann-like adipose stem cells. *J. Mol. Neurosci.* 2012 May 31. (*)

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

I nostri studi sui biomateriali si stanno attualmente focalizzando sull'impiego di nuovi composti con caratteristiche di biocompatibilità e proprietà meccaniche migliorati, particolarmente utili per l'uso nella rigenerazione del tessuto nervoso periferico. Sulla base delle acquisizioni farmacologiche e biomolecolari ottenute nel nostro laboratorio, questi e i precedenti biomateriali verranno funzionalizzati per il *drug delivery* e per l'impiego di *stem cells* allo scopo di migliorare le capacità rigenerative dei tessuti nervosi lesionati, minimizzando le patologie correlate, come il dolore neuropatico.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

1. Prof. Patrizia Procacci (Professore di Istologia), Dipartimento Scienze Biomediche per la Salute, Università degli Studi di Milano, Italia.
2. Prof. Ada Tata (Professore di Biologia), Dipartimento di Biologia e Biotecnologie Charles Darwin, Università La Sapienza, Roma, Italia.
3. Prof. Isabelle Perroteau (Professore di Anatomia e Citologia), Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università di Torino, Italia.
4. Prof. Giorgio Terenghi (*Professor of Tissue Engineering*), Blond McIndoe Laboratories, Manchester Academic Health Science Centre, The University of Manchester, UK.
5. Prof. Lawrence Wrabetz (*Professor of Neuroscience*), Hunter James Kelly Research Institute, School of Medicine and Biomedical Sciences, State University of New York at Buffalo, USA.
6. Prof. Bernhard Bettler (*Professor of Physiology*), Institute of Physiology, Department of Biomedicine, University of Basel, Svizzera.

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

Microscopio Confocale Zeiss, Microscopio Elettronico, Microscopio TIRFM, Realtime PCR, FACS, Stabulario

PAROLE CHIAVE

Sistema Nervoso Periferico, Mielina, GABA, Biomateriali, cellule Staminali Adipose.

UNITA' DI RICERCA INBB
Roma Tre

RESPONSABILE SCIENTIFICO:

MARINO MARIA

LINEA DI RICERCA

Meccanismi alla base dell'interferenza endocrina di flavonoidi di origine nutrizionale e di contaminanti alimentari.

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Marino Maria PO m.marino@uniroma3.it

Non Aderenti INBB

Pallottini Valentina RU vpallott@uniroma3.it
Acconcia Filippo RU acconcia@uniroma3.it
La Rosa Piergiorgio DR plarosa@uniroma3.it
Pellegrini Marco DR mpellegrini@uniroma3.it
Fiocchetti Marco DR mfiocchetti@uniroma3.it
Segatto Marco DR msegatto@uniroma3.it
Pesiri Valeria DR vpesiri@uniroma3.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Indirizzo Università Roma Tre, Dipartimento di Biologia, Viale G. Marconi, 446-00146 Roma

Telefono +39-06 55736345

Fax +39-0655736321

E-mail m.marino@uniroma3.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Roma Tre

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

Studio dei meccanismi molecolari, importanti per la progressione del ciclo cellulare e il differenziamento cellulare, indotti da ormoni estrogeni e la modulazione di tali meccanismi da parte di leganti diversi delle due isoforme di recettori per gli estrogeni quali sostanze di origine vegetale (flavonoidi) e di origine antropica (bisfenolo-A) presenti negli alimenti come costituenti naturali o come inquinanti. Individuazione di una differente suscettibilità tra i sessi a questi interferenti endocrini.

Risultati ottenuti

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza le diverse vie di trasduzione di segnale alla base degli effetti anti-proliferativi dei flavonoidi nutrizionali e quelli proliferativi del bisfenolo-A in diverse linee cellulari di cancro umano. Individuazione di una maggiore suscettibilità dei segnali attivati dagli ormoni estrogeni agli interferenti estrogeni rispetto ai segnali attivati dagli ormoni androgeni.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

1. La Rosa P, Pesiri V, Leclercq G, Marino M, Acconcia F. Palmitoylation regulates 17 β -estradiol-induced estrogen receptor- α degradation and transcriptional activity. *Mol Endocrinol.* 2012 May;26(5):762-74.
2. Marino M, Pellegrini M, La Rosa P, Acconcia F. Susceptibility of estrogen receptor rapid responses to xenoestrogens: Physiological outcomes. *Steroids.* 2012 Aug;77(10):910-7.
3. Bulzomi P, Bolli A, Galluzzo P, Acconcia F, Ascenzi P, Marino M. The naringenin-induced proapoptotic effect in breast cancer cell lines holds out against a high bisphenol a background. *IUBMB Life.* 2012 Aug;64(8):690-6.
4. Fiocchetti M, Ascenzi P, Marino M. Neuroprotective effects of 17 β -estradiol rely on estrogen receptor membrane initiated signals. *Front Physiol.* 2012; 3: 73.
5. Bulzomi P, Galluzzo P, Bolli A, Leone S, Acconcia F, Marino M. The pro-apoptotic effect of quercetin in cancer cell lines requires ER β -dependent signals. *J Cell Physiol.* 2012 227: 1891-1898.
6. Marino M, di Masi A, Trezza V, Pallottini V, Polticelli F, Ascenzi P. Xenosensors CAR and PXR at work: impact on statin metabolism. *Curr Drug Metab.* 2011 Mar;12(3):300-11.
7. Marino M, Masella R, Bulzomi P, Campesi I, Malorni W, Franconi F. Nutrition and human health from a sex-gender perspective. *Mol Aspects Med.* 2011 Feb;32(1):1-70.
8. De Marinis E, Ascenzi P, Pellegrini M, Galluzzo P, Bulzomi P, Arevalo MA, Garcia-Segura LM, Marino M. 17 β -estradiol--a new modulator of neuroglobin levels in neurons: role in neuroprotection against H₂O₂-induced toxicity. *Neurosignals.* 2010;18(4):223-35. Epub 2011 Feb 18.

9. Bolli A, Bulzomi P, Galluzzo P, Acconcia F, Marino M. Bisphenol A impairs estradiol-induced protective effects against DLD-1 colon cancer cell growth. *IUBMB Life*. 2010 Sep;62(9):684-7.
10. Pallottini, V., Scalici, M., Gibertini, G., Marino, M., Trentalance, A. 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme a reductase: A new biomarker of fish exposure to water pollution (2010) *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 85 (4), pp. 381-384.
11. Bolli, A., Marino, M., Rimbach, G., Fanali, G., Fasano, M., Ascenzi, P. Flavonoid binding to human serum albumin (2010) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 398 (3), pp. 444-449.
12. Bulzomi, P., Bolli, A., Galluzzo, P., Leone, S., Acconcia, F., Marino, M. Naringenin and 17 β -estradiol coadministration prevents hormone-induced human cancer cell growth (2010) *IUBMB Life*, 62 (1), pp. 51-60.

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

- 1- impatto degli interferenti endocrini sul livello dei recettori ormonali
- 2- impatto degli interferenti endocrini in cellule bersaglio isolate da individui maschi e femmine
- 3- messa a punto di sistemi diagnostici per determinazione della esposizione di individui maschi e femmine agli interferenti endocrini

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

Guy Leclercq

Institut Jules Bordet –
centre des tumeurs rue Héger-Bordet 1,
1000 Bruxelles

Gerald Rimbach

Dept of Food Sciences
University of Kiel (Germany)

Luis M. Garcia-Segura

Instituto Cajal, CSIC
Madrid

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

- Microscopio elettronico
- Citofluorimetro
- Spettrofluorimetro
- Luminometro
- Microscopio confocale
- Ultracentrifuga

PAROLE CHIAVE

LS4_3 Endocrinology
LS4_6 Cancer and its biological basis
LS3_5 Cell differentiation, physiology and dynamics
LS3_8 Signal transduction
LS8_9 Environmental toxicology

UNITA' DI RICERCA INBB
Sassari

RESPONSABILE SCIENTIFICO

MAIOLI MARGHERITA

LINEA DI RICERCA

Analisi molecolare dei processi di riprogrammazione cellulare

titolo

Analisi dei meccanismi molecolari responsabili del controllo della pluripotenza e plasticità in diverse linee cellulari

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Maioli Margherita

RU

mmaioli@uniss.it

Non Aderenti INBB

Santaniello Sara

DR

sara.santaniello@gmail.com

Pigliaru Gianfranco

DR

gianfranco.pigliaru@tiscali.it

Gualini Sara

A

saragualini@gmail.com

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Laboratorio di Ricerca sulle cellule staminali, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari

Dipartimento di Scienze Biomediche, Viale San Pietro 43/B, 07100 Sassari

Telefono : 079-228277;

Fax : 079-228277

E-mail : mmaioli@uniss.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Laboratorio di Ricerca sulle cellule staminali, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

La Dott.ssa Maioli e il suo gruppo di ricerca si è dedicata allo studio dei meccanismi che regolano la pluripotenza e la plasticità di diversi tipi cellulari, incluse le cellule staminali. In particolare sono state studiate alcune principali proprietà delle cellule staminali: la staminalità, l'autorinnovamento e la pluripotenza, i risultati ottenuti possono essere utilizzati per migliorare le attuali conoscenze dei meccanismi molecolari che controllano la plasticità e l'orientamento verso diversi fenotipi cellulari in condizioni normali e patologiche. Un campo di indagine assolutamente innovativo e molto promettente riguarda l'identificazione di stimoli fisici in grado controllare l'espressione di specifici geni che controllano la plasticità cellulare ed il loro orientamento verso specifici percorsi differenziativi, senza l'ausilio di vettori virali. Fra gli stimoli fisici in grado di impattare con l'omeostasi cellulare sono stati valutati gli effetti differenziativi delle microonde (a 2,4; 5,8; 10,5 Ghz) emesse dall'apparecchiatura R.E.A.C. (Radio-Electrics-Asymmetric-Conveyer) sulla crescita e differenziamento di cellule embrionali murine, staminali mesenchimali umane adulte e fibroblasti umani.

Risultati ottenuti

Sono stati ottenuti importanti risultati nel campo della riprogrammazione cellulare, identificando un nuovo stimolo fisico, il REAC, in grado di modulare in maniera tempo dipendente l'espressione dei geni implicati nel controllo della plasticità cellulare; inoltre con l'ausilio del REAC è stato possibile implementare in maniera significativa l'espressione di specifici fenotipi cellulari a partire da cellule embrionali murine e staminali umane adulte. Sono stati inoltre ottenuti importanti risultati nel campo dell'invecchiamento delle cellule staminali, fenomeno in parte responsabile di numerose malattie degenerative; il REAC si è dimostrato efficace nel contrastare i cambiamenti morfologici e la comparsa del marker specifico di senescenza beta galattosidasi, fenomeni normalmente associati alla senescenza cellulare

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

Ventura C., Cantoni S., Bianchi F., Lionetti V., Cavallini C., Scarlata I., Foroni L., **Maioli M.**, Bonsi L., Alviano F., Fossati V., Bagnara G.P., Pasquinelli G., Recchia F.A., and Perbellini A.

Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. **J Biol Chem.** May 11;282(19):14243-52. Epub 2007 Mar 15

Maioli M., Santaniello S, Montella A, Bandiera P, Cantoni S, Cavallini C, Bianchi F, Lionetti V, Rizzolio F, Marchesi I, Bagella L, Ventura C.

Hyaluronan esters drive Smad gene expression and signaling enhancing cardiogenesis in mouse embryonic and human mesenchymal stem cells. **PLoS One.** 2010 Nov 30;5(11):e15151

Maioli M, Rinaldi S, Santaniello S, Castagna A, Pigliaru G, Gualini S, Fontani V, Ventura C Radio frequency energy loop primes cardiac, neuronal, and skeletal muscle differentiation in mouse embryonic stem cells: a new tool for improving tissue regeneration. *Cell Transplant*. 2011 Sep 22. doi: 10.3727/096368911X600966. [Epub ahead of print] .

Rinaldi S, **Maioli M**, Santaniello S, Castagna A, Pigliaru G, Gualini S, Margotti ML, Carta A, Fontani V, Ventura C. Regenerative treatment using a radioelectric asymmetric conveyor as a novel tool in antiaging medicine: an in vitro beta-galactosidase study. *Clin Interv Aging*. 2012;7:191-4. Epub 2012 Jun 29.

Maioli M , Rinaldi S, Santaniello S, Castagna C, Pigliaru G, Gualini S, Cavallini C, Fontani V, and Ventura C. Radio Electric Conveyed Fields Directly Reprogram Human Dermal-Skin Fibroblasts Toward Cardiac-, Neuronal-, and Skeletal Muscle-Like Lineages. *Cell Transplant* 2012 In press

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

L'osservazione che il destino di cellule staminali può essere orchestrato dal REAC, uno stimolo fisico apre la nuova prospettiva di utilizzare questo strumento per orientare i processi di riprogrammazione cellulare senza dover ricorrere ad approcci di trasferimento genico. La possibilità di modulare l'esito dei diversi processi di autorinnovamento, pluripotenza e plasticità cambiando le caratteristiche di un medesimo stimolo (tempi di esposizione) introdurrebbero elementi di notevole semplificazione procedurale e risparmio di costi nell'ottica di una futura medicina rigenerativa.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

- Prof. Carlo Ventura Laboratory of Molecular Biology and Stem Cell Engineering - National Institute of Biostructures and Biosystems, Bologna, Italy, Malpighi Hospital, University of Bologna, Bologna, Italy,
- Prof. Fabio Recchia: Department of Physiology, New York Medical College, Valhalla, NY, USA e Istituto CNR di Fisiologia Clinica Pisa, Italia.
- Dr. Vincenzo Lionetti Scuola Superiore Sant'Anna di Pisa
IRF/ASMED Firenze, Prof. Salvatore Rinaldi, Dr. Vania Fontani, Dr Alessandro Castagna. L' Istituto Rinaldi Fontani® è un Istituto di cura, ricerca, formazione e divulgazione scientifica nel campo della Neuro Psico Fisiopatologia Adattativa e dell' Ottimizzazione Neuro Psico Fisica® con Tecnologia REAC (CRM Terapia®), insieme all'azienda ASMED, che si occupa della parte tecnica e commerciale dell'apparecchiature REAC. La collaborazione con la Dott.ssa Maioli, che lavora da anni nel campo delle cellule staminali mesenchimali umane ed embrionali murine, prevede l'applicazione della tecnologia REAC per implementare la resa dei diversi processi differenziativi.

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

Cappa a flusso laminare, incubatore a CO₂, microscopio ottico invertito, Gene-Amp PCR system, microscopio confocale, Real-Time PCR, centrifughe, citofluorimetro.

PAROLE CHIAVE

LS Life Sciences

LS3 Cellular and Developmental Biology: cell biology, cell physiology, signal transduction, organogenesis, developmental genetics, pattern formation in plants and animals

LS3_12 Stem cell biology □ LS3_5 Cell differentiation, physiology and dynamics

UNITA' DI RICERCA INBB
Genova

RESPONSABILE SCIENTIFICO

MANDICH ALBERTA, CANDIANI SIMONA, PESTARINO MARIO

LINEA DI RICERCA

Mandich: Laboratorio di Endocrinologia Ambientale

1. Identificazione ed applicazione di biomarcatori della presenza di sostanze ad azione steroideo-mimetica nell'ambiente acquatico
2. Anfibi quale modello chiave complementare degli ambienti intermedi

Pestarino-Candiani: Laboratorio di Neurobiologia dello Sviluppo

3. Ruolo dei microRNA nello sviluppo e differenziamento del sistema nervoso
4. Il pesce zebra come modello per lo studio delle cellule staminali ematopoietiche
5. Evoluzione del sistema nervoso nei cordati: ruolo dell'acido retinoico.

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Alberta Mandich	RU	mandich@unige.it
Simona Candiani	RU	candiani@unige.it
Mario Pestarino	PO	pesta@unige.it
Ilaria Traversi	BC INBB	traversiilaria@gmail.com

Non Aderenti INBB

Cevasco Alessandra	A	cevasco@unige.it
Massari Alessandra	A	massari.ale@gmail.com
Marino Rottigni	PT	rottigni@unige.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Indirizzo DISTAV Università degli Studi di Genova

V.le Benedetto XV, 5

16132 Genova

Telefono 010 3538046

Fax 010 3538047

E-mail: mandich@unige.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Genova

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

Linee di ricerca 1 e 2. Gli studi sugli interferenti endocrini () sono stati focalizzati alla determinazione della condizione di inquinamento ambientale a cui sono sottoposte le popolazioni naturali a valle del fiume Lambro sia mediante valutazione diretta in situ, sia utilizzando un modello (*Xenopus laevis*) in laboratorio.

Linea di ricerca 3. Obiettivo principale è stato isolare micro RNA in un proto cordato, l'anfiosso

Linea di ricerca 4. Il progetto è in fase iniziale e si propone di identificare alcuni dei master gene coinvolti nella staminalità e nell'emopoiesi del pesce zebra

Linea di ricerca 5. Studio del sistema nervoso nei proto cordati e ruolo dell'acido retinoico nella organizzazione e regionalizzazione del sistema nervoso.

Risultati ottenuti

Linee di ricerca 1 e 2. Sono state confermate attività estrogeniche, antiestrogeniche e antiandrogeniche in acqua e sedimenti raccolti a valle dell'immissione del fiume Lambro nel Po, responsabili di fenomeni di femminilizzazione e demascolinizzazione delle popolazioni maschili di teleostei autoctone.

Linea di ricerca 3. Sono stati isolati alcuni micro RNA neurali e descritto il pattern di espressione durante lo sviluppo in anfiosso. Tali studi mettono in evidenza che microrna conservato durante l'evoluzione svolgono un ruolo conservato nel differenziamento del sistema nervoso vedi pubblicazione nr. 9 e 11.

Linea 5. Il gruppo ha già costruito una mappa neurochimica del sistema nervoso di anfiosso (pubbl nr 11)

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012 (* affiliazione INBB)

1. Viganò L., Benfenati E., Bottero S., Cevasco A., Monteverde M., Mandich A. (2010). Endocrine modulation, inhibition of ovarian development and hepatic alterations in rainbow trout exposed to polluted river water. *Env. Poll.*, 158, 3675-3683.

2. Massari A., Urbatzka R., Cevasco A., Canesi L., Lanza C. Scartabelli L., Kloas W., Mandich A. (2010). Aromatase mRNA expression in the brain of adult *Xenopus laevis* exposed to Lambro river water and endocrine disrupting compounds. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 168, 262-268. (*)
3. Traversi I., Mandich A., Cevasco A., Fattore E., Generoso C., Massari A. (2011). Morphological and biochemical responses to environmental contaminants in farmed and wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Biol. Res.* 2011 n.1 - Vol. LXXXIV 110-111. (*)
4. Melià P., Petrillo M., Albertelli G., Mandich A., Gatto M. (2012). A bootstrap approach to account for uncertainty in egg production methods applied to small fish stocks. *Fisheries Research* 117-118: 130-136
5. Candiani S, Moronti L, Pennati R, De Bernardi F, Benfenati F, Pestarino M (2010). The synapsin gene family in basal chordates: evolutionary perspectives in metazoans. *BMC Evol Biol* 10:32.
6. Monticone M, Panfoli I, Ravera S, Puglisi R, Jiang M, Morello R, Candiani S, Tonachini L, Biticchi R, Fabiano A, Cancedda R, Boitani C, Castagnola P (2010). The nuclear genes *Mtfr1* and *Dufdl* regulate mitochondrial dynamic and cellular respiration. *J Cell Physiol.* 225(3):767-76.
7. Panfoli I, Calzia D, Ravera S, Bruschi M, Tacchetti C, Candiani S, Morelli A, Candiano G (2011). Extramitochondrial tricarboxylic acid cycle in retinal rod outer segments. *Biochimie* 93(9):1565-75.
8. Candiani S, Moronti L, De Pietri Tonelli D, Garbarino G, Pestarino M (2011). A study of neural-related microRNAs in the developing amphioxus. *Evodevo* 2(1):15.
9. Humeau Y, Candiani S, Ghirardi M, Poulain B, Montarolo P (2011). Functional roles of synapsin: lessons from invertebrates. *Semin Cell Dev Biol* 22(4):425-33.
10. Candiani S. Focus on miRNAs evolution: a perspective from amphioxus (2012). *Brief Funct Genomics* 11(2):107-17.
11. Candiani S, Moronti L, Ramoino P, Schubert M, Pestarino M. A neurochemical map of the developing amphioxus nervous system. (2012) *BMC Neuroscience* 13:59-94.
12. Monticone M, Daga A, Candiani S, Romeo F, Mirisola V, Viaggi S, Melloni I, Pedemonte S, Zona G, Giaretti W, Pfeffer U, Castagnola P. Identification of a novel set of genes reflecting different in vivo invasive patterns of human GBM cells. *BMC Cancer* 2012 12(1):358.

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Le attuali linee di ricerca proseguiranno.

E' in fase di avvio una collaborazione tra i due gruppi per la valutazione degli effetti di molecole in grado di interferire con il sistema endocrino sulla regolazione dell'espressione di non coding RNA, quali microRNA. Nell'ambito di questa attività verranno integrate le competenze scientifiche e metodologiche dei due gruppi con particolare attenzione agli effetti di una selezione di interferenti endocrini che si sono rivelati di rilievo ambientale nei precedenti studi sul campo.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

Prof. W. Kloas, Freshwater Inland Fisheries, Berlino, Germania

Prof. A. Goksoyr, Università di Bergen, Norvegia

Prof. M. Shubert, Stazione di Biologia Marina di Villefranche, Francia

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

- Per analisi morfologiche e istologiche: preparazione e fissazione di campioni, preparazione di sezioni al microtomo e al criostato, sezioni in resina semifini e ultrafini, microscopia ottica e in fluorescenza. Analisi immunocitochimiche su sezioni e su preparati whole mount. Western blot
- Per misurazione delle concentrazioni plasmatiche e tissutali di ormoni e biomarcatori mediante ELISA
- Per Biologia molecolare (PCR, Real-Time PCR, clonaggio, preparazione di plasmidi ricombinanti, trasfezione transienti o stabili in colture cellulari, colture cellulari, ibridazione in situ whole mount e su sezione, ibridazione in situ di microRNAs mediante utilizzo di sonde LNA e ribosonde per i pri-microRNA, tecniche di microiniezione in zebrafish)
- Per analisi bioinformatiche: analisi dei genomi, ricostruzioni filogenetiche, esperienza nell'annotazione di genomi e nella predizione di geni codificanti. Analisi dei target dei microRNAs.

PAROLE CHIAVE

Environmental biology

Environment/ecology

Aquatic sciences

Developmental biology

UNITA' DI RICERCA INBB
Sassari

RESPONSABILE SCIENTIFICO

MIGHELI QUIRICO

LINEA DI RICERCA

IDENTIFICAZIONE DI FATTORI DI VIRULENZA E DI PATOGENICITÀ IN FUNGHI FITOPATOGENI E PRODUTTORI DI MICOTOSSINE

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Quirico Migheli PA qmigheli@uniss.it

Non Aderenti INBB

Virgilio Balmas	RU	balmas@uniss.it
Barbara Scherm	BC	schirm@uniss.it
Stefano Fiori	DR	stenof@hotmail.it
Francesca Spanu	DR	fspanu@uniss.it
Giovanna Pani	DR	giovanna.pani@virgilio.it
Ismael Malbran	BC	imalbran@yahoo.com.ar
Angela Marcello	PT	amarcell@uniss.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Dipartimento di Agraria - Sezione di Patologia vegetale ed entomologia, Università di Sassari

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Telefono: ++ 39 079 229295

Telefax: ++ 39 079 229316

E-mail: qmigheli@uniss.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Genova

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

1) Diagnosi molecolare ed epidemiologia dei funghi patogeni e micotossigeni

Modello: *Fusarium* spp.

2) Studio dei fattori di virulenza mediante transposon tagging e silenziamento genico

Modello: *Fusarium culmorum*/frumento duro

3) Valutazione dei rischi legati all'impiego di antagonisti microbici e loro meccanismo d'azione

Modello: *Pichia fermentans*

Risultati ottenuti

I risultati ottenuti dal responsabile scientifico dell'unità e dai suoi collaboratori hanno riguardato la messa a punto di un sistema di marcatura genica mediante trasposoni in *F. culmorum*, con lo scopo di identificare le basi molecolari della virulenza e della produzione di micotossine in questo fungo. Inoltre, attraverso lo sviluppo di vettori di silenziamento genico, è stato possibile modulare l'espressione del gene *tri6*, implicato nella biosintesi dei tricoteceni, con una conseguente riduzione della virulenza su frumento duro. Studi ulteriori hanno riguardato l'epidemiologia e la filogenesi molecolare di *Fusarium* spp. agenti di infezioni su pazienti immunocompetenti e immunocompromessi, la biogeografia di *Fusarium* spp. in suoli non coltivati della Sardegna, l'analisi proteomica di *Citrus*, le basi molecolari del differenziamento morfologico del lievito *Pichia fermentans in vitro* e durante lo sviluppo in tessuti di pesca e mela.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012 (il simbolo * indica le pubblicazioni con affiliazione anche al Consorzio)

- 1) MIGHELI Q., BALMAS V., HARAK H., SANNA S., SCHERM B., AOKI T., O'DONNELL K. (2010) Molecular phylogenetic diversity of dermatologic and other human pathogenic *Fusaria* from hospitals in Northern and Central Italy. *Journal of Clinical Microbiology* 48: 1076-1084.*
- 2) BALMAS V., MIGHELI Q., SCHERM B., GARAU P., O'DONNELL K., CECCHERELLI G., KANG S., GEISER D.M. (2010) Multilocus phylogenetics shows high levels of endemic fusaria inhabiting Sardinian soils (Tyrrhenian Islands). *Mycologia* 102: 803-812.*
- 3) MASERTI B.E., DEL CARRATORE R., DELLA CROCE C.M., PODDA A., MIGHELI Q., FROELICHER Y., LURO F., MORILLON R., OLLITRAULT P., TALON M., ROSSIGNOL M. (2011). Comparative analysis of proteome changes induced by the two spotted spider mite *Tetranychus urticae* and methyl jasmonate in citrus leaves. *Journal of Plant Physiology* 168: 392-402.*

- 4) DEL CARRATORE R., MAGALDI E., PODDA A., BEFFY P., MIGHELI Q., MASERTI B.E. (2011) A stress responsive alternative splicing mechanism in *Citrus clementina* leaves. *Journal of Plant Physiology* 168: 952-959.
- 5) SCHERM B., ORRÙ M., BALMAS V., SPANU F., AZARA E., DELOGU G., HAMMOND T.M., KELLER N.P., MIGHELI Q. (2011) Altered trichothecene biosynthesis in *TRI6*-silenced transformants of *Fusarium culmorum* influences the severity of crown and foot rot on durum wheat seedlings. *Molecular Plant Pathology* 12: 759-771.*
- 6) SANNA M.L., ZARA S., ZARA G., MIGHELI Q., BUDRONI M., MANNAZZU I. (2012) *Pichia fermentans* dimorphic changes depend on the nitrogen source. *Fungal Biology* 116: 769-777.*
- 7) FIORI S., SCHERM B., LIU J., FARRELL R., MANNAZZU I., BUDRONI M., MASERTI B.E., WISNIEWSKI M., MIGHELI Q. (2012) Identification of differentially expressed genes associated with changes in the morphology of *Pichia fermentans* on apple and peach fruit. *FEMS Yeast Research* (in press; DOI: 10.1111/j.1567-1364.2012.00829.x).*
- 8) SPANU F., PASQUALI M., SCHERM B., BALMAS V., MARCELLO A., ORTU G., DUFRESNE M., HOFFMANN L., DABOUSSI M.J., MIGHELI Q. (2012) Transposition of the miniature inverted-repeat transposable element *mimp1* in the wheat pathogen *Fusarium culmorum*. *Molecular Plant Pathology* (accepted for publication).*
- 9) FADDA A., SCHIRRA M., D'AQUINO S., MIGHELI Q., BORZATTA V., DELOGU G. (201-) Preparation of β -cyclodextrin-thiabendazole-piperonyl butoxide supramolecular complex and its activity against blue and green mould decay on inoculated satsuma fruit. *Journal of Food Engineering* (submitted).
- 10) SANNA M.L., ZARA G., ZARA S., MIGHELI Q., BUDRONI M., MANNAZZU I. (201-) A putative phospholypase C is involved in *Pichia fermentans* dimorphic transition. *Applied and Environmental Microbiology* (submitted).

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Verrà proseguita l'identificazione di geni coinvolti nel rapporto patogenetico e tossigenico di *F. culmorum*. E' in corso una indagine epidemiologica sulla distribuzione di specie di *Fusarium* agenti di micosi cutanee e profonde negli ambienti ospedalieri italiani. Si intende proseguire la ricerca di sistemi di diagnosi e di lotta nei confronti *Trichoderma* spp. patogeni su funghi coltivati, nonché gli studi volti alla identificazione di lieviti antagonisti nei confronti di specie tossigene di *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

Prof. Samir Jaoua, Qatar University, Doha, Qatar

Dr. M Dufresne, Institut de Biotechnologie des Plantes, Université Paris Sud, Orsay, Francia.

Professor Christian Kubicek, Technical University, Vienna, Austria.

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

L'Unità di Ricerca dispone delle attrezzature necessarie per studi di microbiologia, patologia vegetale e biologia molecolare, nonché di armadi termostatici, celle climatizzate e serre presso il Centro per la Conservazione e la Valorizzazione della Biodiversità Vegetale, Loc. Surigheddu (Alghero)

PAROLE CHIAVE (secondo codici ERC)

1° settore: LS6_7 Microbiology

2° settore: LS2_6 Molecular genetics, reverse genetics and RNAi

3° settore: LS2_1 Genomics, comparative genomics, functional genomics

4° settore: LS8_4 Biodiversity, comparative biology

5° settore: LS9_1 Genetic engineering, transgenic organisms, recombinant proteins, biosensors

UNITA' DI RICERCA INBB
Parma

RESPONSABILE SCIENTIFICO
MOZZARELLI ANDREA

LINEA DI RICERCA:
Struttura e funzione di proteine

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO
Non Aderenti INBB

Campanini Barbara	RU	barbara.campanini@unipr.it
Stefano Bruno	RU	stefano.bruno@unipr.it
Luca Ronda	BC	luca.ronda@unipr.it
Samanta Raboni	BC	samanta.raboni@unipr.it
Gianluca Paredi	BC	gianluca.pared@unipr.it
Laura Tigli	DR	laura.tigli@nemo.unipr.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Indirizzo Viale delle Scienze 23/A, 43126 Parma
Telefono 0521905138
Fax 0521905151
E-mail andrea.mozzarelli@unipr.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Milano

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

Studio della relazione tra struttura, dinamica e funzione di globine, tra cui emoglobina e neuroglobina.

Sviluppo di sostituti del sangue a base emoglobinica.

Studio di O-acetilserina sulfidrilasi ed identificazione di inibitori specifici e reversibili.

Risultati

Si è continuato lo studio delle proprietà dinamiche e funzionali di emoproteine, accoppiando misure di cinetica veloce e di curve di legame con simulazioni molecolari, operando sia in soluzione che su proteine incapsulate in gel di silice. Sono state caratterizzate emoglobine umane ed emoglobine derivanti da pesci modificate con politeilene glicole come potenziali sostituti del sangue.

Si è studiato l'enzima dipendente dal piridossal 5'-fosfato O-acetilserina sulfidrilasi caratterizzandone l'interazione con serina acetiltransferasi. Questi studi hanno portato a sviluppare ed identificare composti organici e pentapetidi che inibiscono l'enzima con affinità nel range del micromolare applicando sia metodiche computazionali che sperimentali. Tali composti sono potenziali antibiotici.

Si sono condotti studi di proteomica su alimenti, in particolare carni suine, che hanno portato ad identificare marker di qualità nel processo di produzione del prosciutto cotto.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012 (Tutte le pubblicazioni elencate riportano l'affiliazione al Consorzio)

1. Salsi E, Bayden A, Spyraakis F, Amadasi A, Campanini B, Bettati S, Cozzini P, Kellogg GE, Cook PF, Dodatko T, Roderick SL, Mozzarelli A.
Design of O-acetylserine sulfhydrylase inhibitors by mimicking Nature
J. Med Chem. 2010, 53, 345-356
2. Salsi E, Campanini B, Bettati S, Raboni S, Roderick S, Cook PF, Mozzarelli A.
A two-step process controls the formation of the bienzyme cysteine synthase complex
J. Biol. Chem. 2010, 285, 12813-12822
3. Tian H, Guan R, Salsi E, Campanini B, Bettati S, Kumar VP, Karsten WE, Mozzarelli A, Cook PF.
Identification of the Structural Determinants for the Stability of Substrate and Aminoacrylate External Schiff Bases in O-Acetylserine Sulfhydrylase-A
Biochemistry, 2010, 49, 6093-6103
4. Ronda L, Bruno S, Bettati S, Mozzarelli A.
Protein crystal microspectrophotometry
Biochim. Biophys. Acta 2011, 1814, 734-741

5. Spyrakis F, Bruno S, Bidon-Chanal A, Luque FJ, Abbruzzetti S, Viappiani C, Dominici P, Mozzarelli A. Oxygen binding to Arabidopsis thaliana AHB2 nonsymbiotic hemoglobin: evidence for a role in oxygen transport. *IUBMB Life* 2011, 63, 355-62
6. Passera E, Campanini B, Rossi F, Casazza V, Rizzi M, Pellicciari R, Mozzarelli A. Human kynurenine aminotransferase II: reactivity with substrates and inhibitors *FEBS J.* 2011, 278, 1882-1900
7. Peracchi A, Mozzarelli A. Exploring and exploiting allostery: Models, evolution, and drug targeting *Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics*, 2011, 1814, 922-933
8. Pioselli B, Paredi G, Mozzarelli A. Proteomic analysis of pork meat in the production of cooked ham *Molecular BioSystems*, 2011, 7, 2252-2260
9. Ahmed MH, Spyrakis F, Cozzini P, Tripathi PK, Mozzarelli A, Scarsdale JN, Safo MA, Kellogg GE. Bound Water at Protein-Protein Interfaces: Partners, Roles and Hydrophobic Bubbles as a Conserved Motif. *PlosOne*. 2011, 6(9):e24712
10. Mozzarelli A, Bettati S, Campanini B, Salsi E, Raboni S, Singh R, Spyrakis F, Kumar VP, Cook PF. The multifaceted pyridoxal 5'-phosphate-dependent *O*-acetylserine sulfhydrylase *Biochem. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics*, 2011, 1814, 1497-1510
11. Conti P, Tamborini L, Pinto A, Blondel A, Minoprio P, Mozzarelli A, De Micheli C. Drug Discovery Targeting Amino Acid Racemases *Chem. Rev.* 2011, 111, 6919-6946, IF 33
12. Paredi GL, Raboni S, Bendixen E, de Almeida A, Mozzarelli A. "Muscle to meat" molecular events and technological transformations: the proteomics insight *J. Proteomics*, 2012, 75, 4275-4289

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Valutazione mediante studi cinetici e di equilibrio del Tertiary Two State model, come base teorica per la comprensione della relazione struttura e funzione dell'emoglobina umana e di altre proteine allosteriche.

Studio delle proprietà di cooperatività di emoglobine da pesci e da *Schapharca inaequalis* nel cristallo, in soluzione e nei gel di silice

Ottimizzazione di inibitori per *O*-acetilserina sulfidrilasi e caratterizzazione delle proprietà dinamiche e funzionali di serina racemasi.

Proteomica di alimenti di origine animale, in particolare, carni suine, applicata alla ottimizzazione del processo di produzione di prosciutto crudo e cotto.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

Glen Kellogg, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, USA

William Royer, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts, USA

Chris Cooper, University of Essex, Colchester, UK

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

Microspettrofotometro in luce polarizzata, rapid scanning stopped-flow, spettrofluorimetro Jobin-Yvon, strumentazione per htp proteomica (2DE, gel picking) e MALDI-TOD-TOF

PAROLE CHIAVE

LS1_1 Molecular biology and interactions

LS1_2 General biochemistry and metabolism

LS2_3 Proteomics

UNITA' DI RICERCA INBB
Milano

RESPONSABILE SCIENTIFICO

NEGRI CESI PAOLA

LINEA DI RICERCA

Effetti epigenetici dei PCB su differenti modelli sperimentali

Effetti genetici ed epigenetici di EDC su parametri centrali e periferici coinvolti nel comportamento alimentare

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Negri Cesi Paola

PA

e-mail: paola.negricesi@unimi.it

Colciago Alessandra

RU

e-mail: alessandra.colciago@unimi.it

Celotti Fabio

PO

e-mail: fabio.celotti@unimi.it

Casati Lavinia

A (assegnista di ricerca)

e-mail: lavinia.casati@unimi.it

Non Aderenti INBB

Mornati Ornella

PT

e-mail: ornella.mornati@unimi.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari - Sezione di Biomedicina ed Endocrinologia

via Balzaretti 9, 20133 Milano

Telefono 02-50318243

Fax 02-50318204

E-mail endimi@unimi.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Milano.

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

Obiettivo globale di questa linea di ricerca è quello di continuare gli studi atti ad approfondire e ampliare le conoscenze sugli effetti di alcuni fra gli EDC più abbondanti nell'ambiente su una serie di parametri sia a livello del SNC sia in organi e tessuti periferici. Gli studi si sono (e saranno) focalizzati sui PCB e sul BPA, di cui si sono valutati e si intendono determinare, nell'animale sperimentale, gli effetti di un'esposizione prenatale e durante l'allattamento a dosi non tossiche. L'utilizzo di linee cellulari selezionate *ad hoc* permetterà inoltre di valutare a livello molecolare/cellulare i parametri più interessanti evidenziati negli esperimenti *ex-vivo*.

Risultati ottenuti

Gli studi effettuati negli anni passati hanno mostrato che, se somministrati alla madre durante la gestazione e l'allattamento, i PCB si accumulano nel SNC della prole e sono ancora presenti nel cervello dell'adulto. Inoltre, l'esposizione prenatale causa, già nell'animale neonato, importanti modificazioni tempo- e sesso-specifiche dell'espressione degli enzimi aromatasi e 5alfa-riduttasi nell'ipotalamo di ratto. Questi enzimi, che convertono il testosterone circolante nei suoi mediatori attivi estradiolo e DHT, determinano di fatto i livelli intracellulari degli steroidi sessuali e la possibilità di influenzare la differenziazione sesso-specifica del cervello. Tali modificazioni permangono anche nell'animale adulto, in alcuni casi abolendo e in altri amplificando il loro normale profilo dimorfico di espressione. Più di recente, in collaborazione con il Dr. Esteller del Cancer Epigenetics & Biology Program (PEBC) sono stati condotti studi di epigenetica nel fegato di ratto, uno degli organi target degli xenobiotici. Tali studi (Casati et al. 2012) hanno evidenziato che l'esposizione in utero ai PCB è in grado di influenzare il profilo trascrittomico epatico alterando le modificazioni post-traduzionali degli istoni (H3K4me3/H4K16Ac); tale effetto è probabilmente dovuto all'induzione dell'espressione degli enzimi di rimodellamento istonico Sirt1 e Jarid1b. Come già osservato nel SNC, anche in questo caso sembra che l'azione più subdola dei PCB sia quella di agire sull'epigenoma in modo differente nel maschio e nella femmina, annullandone il dimorfismo fisiologico. L'esposizione a PCB si è inoltre dimostrata in grado di ridurre in modo significativo i livelli del recettore androgenico (AR). Poiché è noto che AR può agire anche come co-regolatore dell'attività di Jarid1b, e che questo enzima potenzia l'attività trascrizionale di AR, ci si è proposti di iniziare a caratterizzare meglio il legame fra AR e le modificazioni istoniche. Gli esperimenti finora effettuati in vitro hanno mostrato che i PCB modulano, in modo dose-dipendente, l'attività trascrizionale di AR, che risulta ancora più elevata in presenza di Jarid1B (Casati et al. 2012).

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

- Casati L, Sendra R, Colciago A, Negri Cesi P, Berdasco M, Esteller M, Celotti F: Polychlorinated biphenyls (PBC) affect the histone modification pattern in early development of rats: a possible role for androgen receptor-dependent modulation. *Epigenome 4(1):101-112*, 2012 (**affiliazione INBB**)

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

1. Proseguire gli studi già in corso sugli effetti epigenetici dell'esposizione prenatale ai PCB valutandone anche i possibili risvolti trans generazionali; definire meglio il significato funzionale del dimorfismo dell'epigenoma; continuare la caratterizzazione del rapporto fra AR e le modificazione istoniche per comprenderne il significato funzionale.
2. Iniziare una nuova ricerca sull'influenza degli EDC sul comportamento alimentare. E' infatti noto che alcuni EDC, e fra questi il BPA, abbiano attività obesogenica e che l'esposizione prenatale predispone i nuovi nati allo sviluppo di sindrome metabolica. In questi studi, che verranno svolti in collaborazione con un folto gruppo di ricercatori italiani e che prevedono studi in linee cellulari, nell'animale sperimentale e nell'uomo, si cercherà di determinare l'entità dell'impatto di basse dosi di BPA su molteplici target molecolari coinvolti nel metabolismo intermedio e nei meccanismi centrali che regolano l'assunzione di cibo per chiarire se l'esposizione a tale EDC sia coinvolta nella comparsa di obesità e di complicazioni ad essa correlate. Il nostro gruppo si dedicherà in particolare alla valutazione dei possibili effetti dell'esposizione prenatale al BPA sull'espressione e/o sull'attività di una serie di neuropeptidi ipotalamici coinvolti nella regolazione a lungo termine dell'assunzione di cibo e della spesa energetica. Verrà valutata inoltre la possibile interferenza del BPA sul controllo epigenetico dell'espressione di tali neuropeptidi e dei loro recettori.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

- Dr. Manel Esteller, Institut Català d'Oncologia, Direttore del Programma PEBC, Hospital Duran i Reynals, Barcellona, Spagna.

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

Presso la sezione di Biomedicina ed Endocrinologia del Dipartimento di Scienze Farmacologiche e biomolecolari, di cui fa parte l'UR, sono disponibili:

1. attrezzature per studi di biologia cellulare, biologia molecolare e biochimica
 - apparecchiature per RT-PCR, Real-time PCR, sequenziamento DNA, elettroforesi mono e bi-dimensionale, fornetti per ibridazione, transilluminatori UV;
 - liofilizzatore, spettrofotometro, centrifughe e ultracentrifughe;
 - apparecchiature per cromatografia (HPLC, strato sottile, gas-massa per analisi di proteomica, sistema HPLC-chip);
 - luminometro Microbeta e fluorimetro Victor;
2. attrezzature per studi su colture cellulari:
 - cappe sterili, incubatori
 - microscopi a luce normale e in fluorescenza, analizzatore di immagini computerizzato, strumentazione per analisi time-lapse in microscopia (microscopio invertito a fluorescenza, telecamera CCD, software per acquisizione delle immagini in fluorescenza).

L'Unità dispone inoltre di stabulari e dei permessi per detenere piccoli animali di laboratorio

PAROLE CHIAVE

- LS2_2: epigenetics and gene regulation
- LS3_3: endocrinology
- LS3_5: metabolism, biological basis of metabolism related disorders
- LS5_6: environmental and health risk

UNITÀ DI RICERCA INBB
Ancona

RESPONSABILE SCIENTIFICO
OLMO ETTORE

LINEA DI RICERCA
Analisi del trascrittoma nel fossile vivente *Latimeria menadoensis*.

COMPONENTI DEL GRUPPO
Aderenti INBB

Olmo Ettore	PO	e.olmo@univpm.it
Caputo Vincenzo	PA	v.caputo@univpm.it
Canapa Adriana	PA	a.canapa@univpm.it
Barucca Marco	RU	m.barucca@univpm.it
Giovannotti Massimo	BC	m.giovannotti@univpm.it
Nisi Cerioni Paola	PT	p.nisicerioni@univpm.it
Forconi Marikò	DR	m.forconi@univpm.it
Biscotti Maria Assunta	A	assuntabiscotti@tiscali.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche, Facoltà di Scienze, Ancona
Indirizzo via Brece Bianche 60131 Ancona
Telefono 0712204614
Fax 0712204609
e-mail: r.baiocchi@univpm.it;

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA
Roma

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

Nell'ultimo triennio l'attenzione di questa unità di ricerca è stata rivolta prevalentemente alla comprensione della storia evolutiva, attraverso analisi genetiche molecolari, di un raro esemplare di *Latimeria menadoensis*. E' noto che gli esemplari del genere *Latimeria* sono di enorme interesse evolutivo dal momento che rappresentano fossili viventi che possono testimoniare ancora oggi come dovevano essere quei pesci che 400 milioni di anni fa hanno abbandonato la vita acquatica per spostarsi sulla terra e dare origine ai tetrapodi. La possibilità di disporre di tessuto di fegato e gonade di un individuo maschio adulto, sesto ed ultimo esemplare catturato a partire dal 1997, è stata resa possibile grazie ad una convenzione di ricerca fra l'Università Politecnica delle Marche e l'Università di Sam Ratulangi di Manado in Indonesia. Visto l'interesse di questo esemplare gli obiettivi della ricerca hanno riguardato la comprensione dell'evoluzione dei geni coinvolti nello sviluppo, nel differenziamento e nei processi metabolici.

Risultati ottenuti

Il primo studio intrapreso è stato quello di valutare attraverso analisi citofluorimetriche il valore quantitativo del DNA per cellula di *L. menadoensis*, visto che analisi di questo tipo precedentemente effettuate sulla congenerica specie *Latimeria chalumnae* avevano prodotto risultati discordanti. A questi dati sono stati aggiunti inoltre, con analisi in HPLC, quelli relativi alla composizione in GC e al grado di metilazione del DNA. Successivamente in seguito all'estrazione dell'RNA si è proceduto con tecnologia Illumina, ad ottenere i trascrittomi da fegato e gonade del celacanto indonesiano. Dopo assemblaggi e diverse analisi bioinformatiche i due trascrittomi hanno permesso di identificare circa 64.000 trascritti. Il primo risultato ottenuto dal trascrittoma è stato quello di completare un lavoro volto all'identificazione e caratterizzazione della completa famiglia genica della vitellogenina in *Latimeria menadoensis*. Inoltre, grazie l'eccezionale qualità dei dati ottenuti che verranno pubblicati a breve, sono state intraprese delle analisi che hanno portato all'identificazione dei trascritti per le proteine responsabili del differenziamento sessuale, dei processi immunologici, delle vie secretorie e delle risposte agli stress ambientali.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

1. Canapa A, Olmo E, Forconi M, Pallavicini A, Makapedua MD, Biscotti MA, Barucca M. (2012). Composition and phylogenetic analysis of vitellogenin coding sequences in the Indonesian coelacanth *Latimeria menadoensis*. J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.) 00:1-13. DOI: 10.1002/jezb.22455 (**affiliazione INBB**)
2. Pokornà M, Giovannotti M, Kratochvil L, Caputo V, Olmo E, ferguson-Smith MA, Rens W (2012) Conservation of chromosomes syntenic with avian autosomes in squamate reptiles revealed by comparative painting. Chromosoma, DOI 10.1007/s00412-012-0371-z
3. Bo M, Bavestrello G, Barucca M, Makapedua DM, Polisenò A, Forconi M., Olmo E, Canapa A. (2012). Morphological and molecular characterization of the problematic whip black coral genus *Stichopathes*

(Hexacorallia: Antipatharia) from Indonesia (North Sulawesi, Celebes Sea) The Linnean Society of London, *Zoological Journal of the Linnean Society*. DOI: 10.1111/j.1096-3642.2012.00834.x

4. Makapedua DM, Barucca M, Forconi M, Antonucci N, Bizzaro D, Amici A, Carradori MR, Olmo E, Canapa A. (2011). Genome size, GC percentage and 5mC level in the Indonesian coelacanth *Latimeria menadoensis*. *Marine Genomics*. 4:167-172. **(affiliazione INBB)**
5. Corinaldesi C, Barucca M, Luna GM, Dell'Anno A. (2011). Preservation, origin and genetic imprint of extracellular DNA in permanently anoxic deep-sea sediments *Molecular Ecology Mol. Ecol.* 20:642-654.
6. Trifonov VA, Giovannotti M, O'Brien PCM, Wallduck M, Lovell F, Rens W, Parise-Maltempi PP, Caputo V, Ferguson-Smith MA (2011) Chromosomal evolution in Gekkonidae.I. Chromosomes painting between *gecko* and *Hemidactylus* species reveals phylogenetic relationships within the group. *Chromosome Res.* 19: 843-955
7. Pokornà M, Giovannotti M, Kratochvil L, Kasai F, Trifonov VA, O'Brien PCM, Caputo V, Olmo E, Ferguson-smith MA, Rens W (2011) Strong conservation of the bird Z chromosome in reptilian genomes is revealed by comparative painting despite 275 My divergence. *Chromosoma* 120(5) 455-468
8. Caputo V, Giovannotti M, Nisi Cerioni P, Splendiani A, Tagliavini VA, Olmo E (2011) Chromosomal study of a lamprey (*Lampetra zanandrei* Vladykov 1955) (Petromyzonida: Petromyzontiformes) conventional and FISH analysis. *Chromosome Res.* 19: 481-491.
9. Morescalchi MA, Barucca M, Stingo V, Capriglione T. (2010). Polypteridae (Actinopterygii: Cladistia) and DANA-SINEs insertions. *Mar. Genomics*. 3: 79-84.
10. La Mesa M, Caputo V, Eastman JT (2010) Some reproductive traits of the Tristan klipfish, *Bovichtus diacanthus* (Carmichael 1819) (Notothenioidae: Bovichtidae) from Tristan da Cunha (South Africa) *Polare Biology* 33: 337-346
11. Barucca M, Biscotti MA, Forconi M, Regoli F, Olmo E, Canapa A. (2010). Characterization and phylogenetic analysis of vitellogenin coding sequences in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. *J. Exp. Zool (Mol. Dev. Evol.)*. 314B: 645-652. **(affiliazione INBB)**
12. Giovannotti M, Caputo V, O'Brien PCM, Lovell FL, Trifonov V, Nisi Cerioni P, Olmo E, Ferguson-Smith MA, Rens W (2010) Skinks (Reptilia: Scincidae) have highly conserved karyotypes as revealed by chromosome painting *Cytogenet Genome Res* 127: 224-231

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER PROSSIMI TRE ANNI

Visti i risultati ottenuti, per i prossimi tre anni si intende proseguire lo studio intrapreso sul trascrittoma di *Latimeria menadoensis*, attraverso l'elaborazione bioinformatica volta all'identificazione degli oltre 64.000 trascritti che saranno di estremo interesse per comprendere la storia evolutiva di molti geni.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

Per lo studio dei geni della determinazione e del differenziamento sessuale in *Latimeria*, l'unità collabora con il Prof. **Manfred Schartl**, del Physiological Chemistry Biocenter, University of Wuerzburg, (Wuerzburg, Germania).

Per lo studio degli elementi trasponibili attivi in *Latimeria* è in atto una collaborazione con il Prof. **Jean Nicolas Volff** dell'Institut de Génétique Fonctionnelle de Lyone, Université de Lyone (Lione, Francia).

L'unità inoltre fa parte del Coelacanth Genome Project coordinato dalla Dr **Jessica Alföldi** del BROAD Institute (Cambridge, MA, USA).

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

1. Sequenziatore automatico di acidi nucleici ABI Prism Genetic Analyze 310 Applied Biosystems
2. P.A.L.M. laser dissecting microscope (Olympus)
3. Fotomicroscopio a fluorescenza con analizzatore di immagine (Olympus)
4. Sistemi di amplificazione genica PCR System 2004(Perkin Elmer) e MyCycler (BioRad)
5. IQ5 multicolor Real-Time PCR detection system (BioRad)
6. Citofluorimetro COULTER EPICS XL

PAROLE CHIAVE

Latimeria menadoensis, coelacanth, transcriptome, gene evolution.

UNITA' DI RICERCA INBB
Roma

RESPONSABILE SCIENTIFICO

PALLESCHI GIUSEPPE

LINEA DI RICERCA

Biosensori

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Palleschi Giuseppe	PO	palleschi@uniroma2.it
Moscone Danila	PO	moscone@uniroma2.it
Ricci Francesco	RU	Francesco.ricci@uniroma2.it
Micheli Laura	RU	Laura.micheli@uniroma2.it
Valentini Federica	RU	Federica.valentini@uniroma2.it
Arduini Fabiana	RU	Fabiana.arduini@uniroma2.it

Non Aderenti INBB

Volpe Giulia	PT	Giulia.volpe@uniroma2.it
Piermarini Silvia	PT	Silvia.piermarini@uniroma2.it
Romanizzo Daniela	BC	Daniela.romanazzo@uniroma2.it
Neagu Daniela	BC	Daniela.neagu@uniroma2.it
Porchetta Alessandro	DR	Alessandro.porchetta@uniroma2.it
Dell'Unto Francesca	DR	francesca@dellunto.net

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Dipartimento di Chimica Università di Roma Tor Vergata
Via della Ricerca Scientifica 00133 Roma palleschi@uniroma2.it
0672594423
062024342

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Roma

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

Sviluppo ed applicazione di biosensori ed immunosensori in campo clinico , alimentare ed ambientale.

Risultati ottenuti

Nel settore diagnostico-clinico si sono sviluppate sonde DNA per la misura di fattori di trascrizione in sangue intero, inoltre si sono preparati sensori immunologici per la determinazione della celiachia. E biosensori per la misura dell'acido lattico ed alfa amilasi nella saliva

Nel settore alimentare si sono sviluppati sensori per la misura della salmonella nelle carni e dello stafilococco aureo.

E' stato inoltre messo a punto un metodo elettrochimico per la misura del piombo nel latte ed i pesticidi e micotossine nell'olio di oliva

In campo ambientale si sono misurati tramite inibizione enzimatica pesticidi organofosforici e carbammici oltre all'ammonio nelle acque potabili e a metalli pesanti nelle acque. Inoltre è stato assemblato un prototipo per la misura dei gas nervini nell'aria.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012 (tutte con affiliazione all'INBB)

Jacopo M. Legramante, Sergio Sacco, Patrizio Crobeddu, Andrea Magrini, Federica Valentini, PALLESCHI G, Marco Pallante, Rita Balocchi, Ivo Iavicoli, Antonio Bergamaschi, Alberto Galante, Luisa Campagnolo, and Antonio Pietroiusti (2012). Changes in Cardiac Autonomic Regulation after Acute Lung Exposure to Carbon Nanotubes: Implications for Occupational Exposure . JOURNAL OF NANOMATERIALS, vol. 2012, p. 1-9, ISSN: 1687-4110, doi: 10.1155/2012/397206

Sandra Perez Rafael, Alexis Vallée-Bélisle, Esteve Fabregas, Kevin Plaxco, Palleschi G, and Francesco Ricci (2012). Employing the Metabolic "Branch Point Effect" to Generate an All-or-None, Digital-like Response in Enzymatic Outputs and Enzyme-Based Sensors. ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 84, p. 1076-1082, ISSN: 0003-2700, doi: 10.1021/ac202701c

Valentini, F., Cristofanelli, L., Carbone, M., Palleschi G (2012). Glassy carbon electrodes modified with hemin-carbon nanomaterial films for amperometric H₂O₂ and NO₂ - detection. *ELECTROCHIMICA ACTA*, vol. 63 , p. 37-46, ISSN: 0013-4686, doi: 10.1016/j.electacta.2011.12.027

Federica Valentini, *, Alessia Diamanti, M. Carbone, E.M. Bauerb, Palleschi G (2012). New cleaning strategies based on carbon nanomaterials applied to the deteriorated marble surfaces: A comparative study with enzyme based treatments. *APPLIED SURFACE SCIENCE*, vol. 258, p. 5965-5980, ISSN: 0169-4332, doi: 10.1016/j.apsusc.2012.01.076

Biagiotti, V., Porchetta, A., Desiderati, S., Plaxco, K.W., Palleschi G, Ricci, F. (2012). Probe accessibility effects on the performance of electrochemical biosensors employing DNA monolayers. *ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY*, vol. 402 (1) , pp. 413-421 , p. 413-421, ISSN: 1618-2642, doi: 10.1007/s00216-011-5361-0

Arduini, F., Neagu, D., Dall'Oglio, S. Danila Moscone, D., PALLESECHI G (2012). Towards a Portable Prototype Based on Electrochemical Cholinesterase Biosensor to be Assembled to Soldier Overall for Nerve Agent Detection. *ELECTROANALYSIS*, vol. 24, p. 581-590, ISSN: 1040-0397, doi: DOI: 10.1002/elan.201100540

J. Calvo Quintana, F. Arduini, A. Amine, F. Punzo, G. Li Destri, C. Bianchini, D. Zane, A. Curulli, Palleschi G, D.Moscone (2011). A comparative study of bismuth-modified screen-printed electrode for lead detection (part one). *ANALYTICA CHIMICA ACTA*, vol. 707, p. 171-177, ISSN: 0003-2670, doi: 10.1016/j.aca.2011.08.052

IVANOV A.N, YOUNUSOV R.R, EVTUGYN G.A, ARDUINI F, MOSCONE D, PALLESECHI G (2011). Acetylcholinesterase biosensor based on single-walled carbon nanotubes-Co phthalocyanine for organophosphorus pesticides detection. *TALANTA*, vol. 85, p. 216-221, ISSN: 0039-9140, doi: 10.1016/j.talanta.2011.03.045

L. PERSICHETTI, F. TOMBOLINI, S. CASCIARDI, M. DI OCIAIUTI, M. FANFONI, PALLESECHI G, A. SGARLATA, F. VALENTINI, AND A. BALZAROTTI (2011). Folding and stacking defects of graphene flakes probed by electron 2 nanobeam. *APPLIED PHYSICS LETTERS*, vol. 99, ISSN: 0003-6951, doi: 10.1063/1.3615802

FABIANA ARDUINI, COSTANZA MAJORANIA, AZIZ AMINE, DANILA MOSCONE, PALLESECHI G (2011). Hg²⁺ detection by measuring thiol groups with a highly sensitive screen-printed electrode modified with a nanostructured carbon black film. *ELECTROCHIMICA ACTA*, vol. 56, p. 4209-4215, ISSN: 0013-4686

PIETROIUSTI A, MASSIMIANI M, FENOGLIO I, COLONNA M, VALENTINI F, PALLESECHI G, CAMAIONI A, MAGRINI A, SIRACUSA G, BERGAMASCHI A, SGAMBATO A, CAMPAGNOLO L (2011). Low doses of pristine and oxidized single-wall carbon nanotubes affect Mammalian embryonic development. *ACS NANO*, vol. 5(6), p. 33-4624, ISSN: 1936-0851

FABIANA ARDUINI, DANIELA SORDI, VALERIA CONTE, DANILA MOSCONE, PALLESECHI G (2011). Real Time Monitoring of Hydrogen Peroxide Consumption in an Oxidation Reaction in Molecular Solvent and Ionic Liquids by Hydrogen Peroxide Electrochemical Sensor. *CHEMSUSCHEM*, vol. published online: 18 MAY 2011, ISSN: 1864-5631, doi: 10.1002/cssc.201000386

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Sviluppo di un sistema di misura immunologico wash free per il controllo dei batteri patogeni nelle verdure della IV gamma.

Sviluppo di sensori a DNA ed immunosensori per la misura di tossine marine ed organostannici in acque di mare.

Determinazione del virus dell'epatite A con un nuovo metodo immunologico.

Misura dell'arsenico, piombo, cadmio e Rame in alimenti e nelle acque.

Determinazione della palitossina nelle acque e negli alimenti

Studio di nuovi biosensori per il monitoraggio di metaboliti nella fermentazione alcolica

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

Università S. Barbara California, USA; Università di Mohammedia Marocco; Università autonoma Barcelona, Spagna

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

Autolab, Potenziosati, Potenzimetri, pHmetri, ultracentrifuga, HPLC, spettrofotometro e spettrofluorimetro.

PAROLE CHIAVE

Biosensori, immunosensori , sensori DNA Nanotecnologie, elettrochimica.

UNITA' DI RICERCA INBB
Genova

RESPONSABILE SCIENTIFICO

RELINI ANNALISA

LINEA DI RICERCA

Studio del processo di aggregazione amiloide mediante microscopia a forza atomica

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Cavalleri Ornella	RU	cavalleri@fisica.unige.it
Relini Annalisa	RU	relini@fisica.unige.it

Non Aderenti INBB

Rolandi Ranieri	PO	rolandi@fisica.unige.it
Robello Mauro	PO	robello@fisica.unige.it
Pesce Alessandra	RU	pesce@fisica.unige.it
Pellistri Francesca	RU	pellistri@fisica.unige.it
Penco Amanda	BC	pencoamanda@gmail.com
Gatta Elena	BC	gatta@fisica.unige.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Indirizzo Dipartimento di Fisica, Via Dodecaneso 33, 16146 Genova

Telefono 010 3536267

Fax 010 314218

E-mail relini@fisica.unige.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Genova

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

Comprensione dei meccanismi molecolari del processo di aggregazione amiloide e studio dei fattori che lo influenzano.

Risultati ottenuti

Si è utilizzata la microscopia a forza atomica per caratterizzare gli aggregati prefibrillari e/o fibrillari formati in condizioni diverse da proteine amiloidogeniche quali HypF-N, beta2-microglobulina, apolipoproteina A-I, acilfosfatasi, alfa-sinucleina, atassina 1, Abeta. Studiando il processo di oligomerizzazione di acilfosfatasi in presenza del cofattore eparan solfato si è visto che quest'ultimo viene direttamente coinvolto nella formazione degli oligomeri proteici. Si è studiato l'effetto di inibitori del processo di aggregazione, in particolare si è mostrato che un antibiotico della classe delle tetracicline, la doxiciclina, inibisce la fibrillogenesi della beta2-microglobulina e favorisce la dissoluzione di fibrille già formate. L'analisi AFM ha permesso inoltre di ottenere informazioni sul meccanismo di azione di chaperoni molecolari nel ridurre la tossicità delle specie oligomeriche, mostrando che i chaperoni promuovono l'organizzazione degli oligomeri in ammassi estesi; questo porta ad una diminuzione della mobilità degli oligomeri e alla schermatura dei gruppi reattivi esposti. Dall'analisi delle immagini AFM di protofibrille di HypF-N, attraverso la teoria dei polimeri si sono ottenute informazioni sulle proprietà meccaniche degli aggregati prefibrillari. Infine si è studiata l'interazione di diversi costrutti di atassina 1 con membrane modello e cellule, e si è mostrato che le forme espanse patologiche danno luogo ad una più marcata destabilizzazione della membrana.

I risultati sopra menzionati sono stati ottenuti nell'ambito di collaborazioni con i gruppi di Vittorio Bellotti (Pavia), Fabrizio Chiti (Firenze), Massimo Stefani (Firenze), Renata Piccoli (Napoli), Patrizia Polverino De Laureto (Padova), Piero Pucci (Napoli), Rino Esposito (Udine).

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012 (* affiliazione INBB)

1. A. Relini, S. Torrassa, R. Ferrando, R. Rolandi, S. Campioni, F. Chiti, A. Gliozzi (2010) Detection of populations of amyloid-like protofibrils with different physical properties. *Biophys. J.* 98, 1277-1284. (*)
2. S. Campioni, B. Mannini, M. Zampagni, A. Pensalfini, C. Parrini, E. Evangelisti, A. Relini, M. Stefani, C. M. Dobson, C. Cecchi, F. Chiti (2010) A causative link between the structure of aberrant protein oligomers and their toxicity. *Nature Chem. Biol.* 6, 140-147.
3. D. M. Monti, F. Guglielmi, M. Monti, F. Cozzolino, S. Torrassa, A. Relini, P. Pucci, A. Arciello, R. Piccoli (2010). Effects of a lipid environment on the fibrillogenic pathway of the N-terminal polypeptide of human Apolipoprotein A-I, responsible for in vivo amyloid fibril formation. *Eur. Biophys. J.* 39, 1289-1299. (*)

4. S. Giorgetti, S. Raimondi, K. Pagano, A. Relini, M. Bucciantini, A. Corazza, F. Fogolari, L. Codutti, M. Salmona, P. Mangione, L. Colombo, A. De Luigi, R. Porcari, A. Gliozzi, M. Stefani, G. Esposito, V. Bellotti, M. Stoppini (2011) Effect of tetracyclines on the dynamics of formation and destructure of beta2-microglobulin amyloid fibrils. *J. Biol. Chem.* 286, 2121-2131. (*)
5. S. Raimondi, F. Guglielmi, S. Giorgetti, S. Di Gaetano, A. Arciello, D. M. Monti, A. Relini, D. Nichino, S. M. Doglia, A. Natalello, P. Pucci, P. Mangione, L. Obici, G. Merlini, M. Stoppini, P. Robustelli, G. Gaetano Tartaglia, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, R. Piccoli, V. Bellotti. (2011) Effects of disease-associated mutations on the aggregation process of the 93-residue N-terminal fragment of human apolipoprotein A-I. *J. Mol. Biol.* 407, 465-476. (*)
6. G. De Franceschi, E. Frare, M. Pivato, A. Relini, A. Penco, E. Greggio, L. Bubacco, A. Fontana and P. Polverino de Laureto (2011) Structural and morphological characterization of aggregated species of α -synuclein induced by docosahexaenoic acid. *J. Biol. Chem.* **286**, 22262-22274.
7. A. Arciello, N. De Marco, R. Del Giudice, F. Guglielmi, P. Pucci, A. Relini, D. M. Monti, R. Piccoli (2011) Insights into the fate of the N-terminal amyloidogenic polypeptide of ApoA-I in cultured target cells. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 2652-2663. (*)
8. S. Rigacci, V. Guidotti, M. Bucciantini, D. Nichino, A. Relini, A. Berti, M. Stefani (2011) A β (1-42) aggregates into non-toxic amyloid assemblies in the presence of the natural polyphenol oleuropein aglycon. *Curr. Alzheimer Res.* **8**, 841-852.
9. S. Merlo, G. Barillaro, F. Carpignano, G. Silva, S. Surdo, L. M. Strambini, S. Giorgetti, D. Nichino, A. Relini, G. Mazzini, M. Stoppini, V. Bellotti (2012) Fibrillogenesis of human beta2-microglobulin in three-dimensional silicon microstructures. *Journal of Biophotonics* **5**, 785-792.
10. L. Mapelli, C. Canale, D. Pesci, S. Averaimo, F. Guizzardi, V. Fortunati, L. Falasca, M. Piacentini, A. Gliozzi, A. Relini, M. Mazzanti, C. Jodice (2012) Toxic effects of expanded ataxin-1 involve mechanical instability of the nuclear membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **1822**, 906-917.
11. N. Motamedi-Shad, T. Garfagnini, A. Penco, A. Relini, F. Fogolari, A. Corazza, G. Esposito, F. Bemporad, F. Chiti (2012) Rapid oligomer formation of human muscle acylphosphatase induced by heparan sulfate. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 547-554.
12. B. Mannini, R. Cascella, M. Zampagni, M. A. W. H. van Waarde-Verhagen, S. Meehan, C. Roodveldt, S. Campioni, M. Boninsegna, A. Penco, A. Relini, H. H. Kampinga, C. M. Dobson, M. R. Wilson, C. Cecchi, F. Chiti (2012) Molecular chaperones reduce the toxicity of aberrant protein oligomers: molecular insight into the mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 12479-12484.

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Verrà proseguito lo studio del processo di aggregazione amiloide, con particolare attenzione agli effetti di mutazioni della sequenza peptidica sulle proprietà morfologiche e strutturali degli aggregati. Si analizzerà l'interazione di membrane biomimetiche e cellule con gli aggregati proteici per saggiarne la tossicità. Si intende inoltre proseguire lo studio di inibitori del processo di aggregazione, quali polifenoli, tetracicline e chaperoni molecolari, e di cofattori come agenti di crowding e componenti della matrice extracellulare.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

Thomas Hauss, Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie.
Dmitri Svergun, European Molecular Biology Laboratory, Hamburg.

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

Microscopio a forza atomica Multimode Picoforce con stazione di controllo Nanoscope V (Veeco-Digital Instruments)
Microscopio a forza atomica Dimension 3000 con stazione di controllo Nanoscope IIIa (Veeco-Digital Instruments)
Apparecchiatura per misure di light scattering e potenziale zeta Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments)
Spettrofluorimetro Fluorolog (Horiba Jobin-Yvon)
Laboratorio dotato di strumentazione per la preparazione e caratterizzazione di membrane modello (bilance di Langmuir NIMA e R&K, spettrofotometro, sonicatore, sistema di dialisi Dianorm, estrusore,...)

PAROLE CHIAVE

microscopia a forza atomica - aggregazione proteica - fibrille amiloidi - membrane biomimetiche

UNITA' DI RICERCA INBB
Padova

RESPONSABILE SCIENTIFICO:

RIGO ADELIO

LINEA DI RICERCA

1. Biomolecole coinvolte nelle reazioni di ossido-riduzione e nello "stress ossidativo";
2. Studi di metabolomica in fluidi biologici mediante NMR
3. Studio di interazioni bimolecolari mediante SPR per applicazioni biomediche;

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Di Paolo Maria Luisa	RU	marialuisa.dipaolo@unipd.it
Rigo Adelio	PO	adelio.rigo@unipd.it
Rossetto Monica	BC	monica.rossetto@unipd.it
Vanzani Paola.	BC	paola.vanzani@unipd.it
Zennaro Lucio.	RU	lucio.zennaro@unipd.it

Non Aderenti INBB

Bonaiuto Emanuela	BC	emanuela.bonaiuto@unipd.it
-------------------	----	----------------------------

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Università di Padova – Dipartimento di Medicina Molecolare - (sede Chimica Biologia)

Indirizzo... Via G. Colombo 3, 35131 -PADOVA

Telefono 049-8276119/8276264.

Fax ...049-8073310

E-mail: marialuisa.diapolo@unipd.it; lucio.zennaro@unipd.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Padova

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

1. Mettere in luce i vari tipi di interazioni che controllano il "docking" di molecole (substrati ed inibitori) con il sito catalitico di alcuni metallo-enzimi (ammino ossidasi, etc.) e chiarire i meccanismi dei processi in cui sono coinvolte molecole dotate di "attività antiossidante";
2. Studio di metabolomica mediante Risonanza Magnetica Nucleare (¹H-NMR) in biofluidi umani per lo screening di nuovi biomarker e/o identificazione di profili metabolici specifici presenti in alcune patologie.
3. Studiare l'interazione bimolecolare proteina-proteina GPx7 - PDI (Glutation perossidasi 7 e Disolfuro isomerasi) mediante SPR (Surface plasmon Resonance), con potenziale applicazione in campo biomedico.

Risultati ottenuti

1. Gli studi di struttura-funzione su due diverse ammino ossidasi (enzimi che generano acqua ossigenata), una di origine vegetale (da germogli di pisello) ed una da adipociti umani, hanno consentito l'individuazione dei parametri strutturali di una molecola (substrato e inibitore) necessari per ottimizzare l'interazione con il sito attivo di questi enzimi. Sono stati sviluppati e messi a punto metodi per valutare le proprietà antiossidanti (in particolare nella perossidazione lipidica) di alcuni polifenoli e vitamine, i meccanismi con cui intervengono nei processi di "scavenging" di radicali liberi ed i possibili effetti sinergici. E' stata inoltre messa in luce in alcuni alimenti la presenza di radicali liberi stabili, indice di una elevata capacità antiossidante di questi alimenti.
2. Metabolomica. L'analisi preliminare di fluidi biologici di individui sani e pazienti affetti da varie patologie (es. adenocarcinoma) ha messo in luce le zone spettrali in cui la varianza tra individui sani e pazienti è significativa. L'aumento della numerosità dei campioni e ulteriori indagini potranno consentire l'individuazione dei metaboliti coinvolti in alcune patologie e spiegare possibili meccanismi coinvolti.
3. Lo studio mediante SPR ha dimostrato che esiste una interazione bimolecolare tra GPx7 e PDI e ha permesso di calcolare le costanti cinetiche di associazione e dissociazione. Lo studio comparativo condotto con GPx di drosophila e con mutanti ha evidenziato le peculiarità strutturali di GPx7 convalidando i dati di attività enzimatica.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012 (* affiliazione anche al Consorzio)

- Bonaiuto E, Lunelli M, Scarpa M, Vettor R, Milan G, Di Paolo ML (2010) A structure-activity study to identify novel and efficient substrates of the human semicarbazide-sensitive amine oxidase/VAP1 enzyme. *Biochimie*, 92 (7): 858-868 (*)
- ÉNZSOLY A, DUNKEL P, RÉCSÁN Z, GY, RFFY H, TÓTH J, MARICS G, BORI Z, TÓTH M, ZELKÓ R, DI PAOLO M.L., MÁTYUS P, NÉMETH J (2011). Preliminary studies of the effects of vascular adhesion protein-1 inhibitors on experimental corneal neovascularization. *JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION*, 118(7):1065-9.
- DI PAOLO M.L., LUNELLI M, FUXREITER M, RIGO A, SIMON I, SCARPA M (2011). Active site residue involvement in mono- or di-amine oxidation catalyzed by pea seedling amine oxidase. *Febs J.* 278 :1232–1243 (*)
- Zonin Elisabetta, Moscatiello Roberto, Manuela Miuzzo, Nadia Cavallarini, Maria Luisa Di Paolo, Dorianna Sandonà, Oriano Marin, Marisa Brini, Alessandro Negro, Lorella Navazio (2011) “TAT-mediated Aequorin Transduction: an Alternative Approach to Effective Calcium Measurements in Plant”. *Cells. Plant and Cell Physiology*. Vol 52 (12): 2225-2235
- Bonaiuto Emanuela • Anna Minarini • Vincenzo Tumiatti • Andrea Milelli • Michele Lunelli • Maurizio Pegoraro • Valeria Rizzoli • Maria Luisa Di Paolo (2012) Synthetic polyamines as potential amine oxidase inhibitors: a preliminary study. *Amino Acids* 42:913–928 (*)
- Vanzani-P, Rossetto-M, De Marco-V, Sacchetti-LE, Paoletti-MG, Rigo-A. (2011) Wild Mediterranean plants as traditional food: a valuable source of antioxidants. *Journal of Food Science*. 76:C46-C51 (*)
- Vanzani-P, Rossetto-M, De Marco-V, Rigo-A, Scarpa-M. (2011) Efficiency and capacity of antioxidant of rich foods in trapping peroxy radicals: a full evaluation of radical scavenging activity. *Food Research International*. 44:269-275 (*)

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

1. Sviluppare nuovi tipi di “scaffolds” per inibitori di ammino ossidasi, con potenziale sviluppo farmacologico per patologie associate allo stress ossidativo (dalla neuro degenerazione ai processi infiammatori).
2. Studiare la bioattività di alcune classi di antiossidanti, con particolare riguardo al loro coinvolgimento nei meccanismi redox ed ai loro effetti indiretti.
3. Studio e caratterizzazione di recettori plasmatici e di membrana coinvolti in patologie androgene collegate a malattie degenerative.
4. Correlazioni fra profili metabolici e trattamenti terapeutici in pazienti affetti da varie tipologie di cancro.

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L’UNITÀ DI RICERCA

NMR 300 MHz (Bruker) con Console Advance III (Bruker)
Microscopio STM AFM (Park Scientific)
EPR ED 200 (Bruker)
FTIR Nexus (Thermo Fisher Scientific)
HPLC con Coularray detection
SPR Biacore T100 (GE Healthcare)

PAROLE CHIAVE:

biophysics;
metabolomics;
Chemical biology;
environmental biotechnology.

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

RESPONSABILE SCIENTIFICO

RODA ALDO

LINEA DI RICERCA

Biotechnologie analitiche e bioanalitica applicata

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Aldo Roda	PO	aldo.roda@unibo.it
Guardigli Massimo	PA	massimo.guardigli@unibo.it
Mirasoli Mara	RU	mara.mirasoli@unibo.it
Michelini Elisa	RU	elisa.michelini8@unibo.it

Non Aderenti INBB

Simoni Patrizia	RU	patrizia.simoni@unibo.it
Cevenini Luca	BC	luca.cevenini5@unibo.it
Colliva Carolina	DR	carolina.colliva2@unibo.it
Zangheri Martina	DR	martina.zanghei2@unibo.it
Spinozzi Silvia	DR	silvia.spinozzi2@unibo.it
Camborata Cecilia	DR	cecilia.camobrata2@unibo.it
Di Fusco Massimo	BC	massimo.difusco@unibo.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Indirizzo Dipartimento di Chimica "G.Ciamician", Università di Bologna, Via Selmi 2, 40126, Bologna

Telefono 051 6364166

Fax 051 6364166

E-mail aldo.roda@unibo.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Bologna

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

- Sviluppo di metodi di analisi d'immagine luminescente ultrasensibile (bio-, chemi-, elettro-, e termochemiluminescenza, fluorescenza e fluorescenza risolta nel tempo) per la localizzazione e determinazione quantitativa di analiti in tessuti e singole cellule mediante immunoistochimica e ibridizzazione "in situ". Applicazioni in biochimica, immunologia e "screening" di farmaci.
- Clonaggio e applicazione di nuovi geni reporter bioluminescenti: biosensori cellulari, imaging molecolare in vivo e tecniche bioanalitiche di tipo multiplex basate su meccanismi di riconoscimento biomolecolare.
- Sviluppo di Biosensori ottici strumentazioni miniaturizzate per analisi sul campo (POCT) basate su principi di luminescenza (chemiluminescenza, luminescenza elettrogenata e termoluminescenza) e tecniche di microfabbricazione e microfluidica.

Risultati ottenuti

- Biosensori cellulari per lo studio dell'attività di enzimi della famiglia CytP450 e per la determinazione di interferenti endocrini basati su nuovi geni reporter bioluminescenti con emissione a diverse lunghezze d'onda.
- Modelli animali di imaging bioluminescente per lo studio dello svuotamento gastrico e processi tumorali.
- Tecniche di imaging microscopico in chemiluminescenza per la colocalizzazione di marcatori di neoplasie e per l'identificazione di leganti proteici in opere pittoriche.
- Applicazione dell'elettrochemiluminescenza all'imaging microscopico.
- Rivelatore portatile basato su di un sensore CCD raffreddato termoeletttricamente per misure di biochemiluminescenza in dispositivi analitici miniaturizzati.
- Metodi di analisi immunometrici di tipo Lateral-Flow Immunoassay (LFIA) con rivelazione in chemiluminescenza per la determinazione di molecole di interesse forense (esplosivi) o tossicologico (micotossine) mediante rivelatori portatili per chemiluminescenza.
- Marcatori termochemiluminescenti (nanoparticelle di silice con molecole termochemiluminescenti) e studio della loro applicazione in metodi bioanalitici ultrasensibili con rivelazione termochemiluminescente.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

1. Cevenini L, Michelini E, D'Elia M, Guardigli M, Roda A. Dual-color bioluminescent bioreporter for forensic analysis: evidence of androgenic and anti-androgenic activity of illicit drugs. *Anal Bioanal Chem.* 2012, DOI: 10.1007/s00216-012-6416-6. (Affiliazione INBB)
2. Mirasoli M, Buragina A, Dolci LS, Simoni P, Anfossi L, Giraudi G, Roda A. Chemiluminescence-based biosensor for fumonisins quantitative detection in maize samples. *Biosens. Bioelectron.* 2012, 32(1): 283-287. (Affiliazione INBB)
3. Roda A, Mirasoli M, Roda B, Bonvicini F, Colliva C, Reschiglian P. Recent developments in rapid multiplexed bioanalytical methods for foodborne pathogenic bacteria detection. *Microchim. Acta* 2012, 178(1-2):7-28. (Affiliazione INBB)
4. Mirasoli M, Buragina A, Dolci LS, Guardigli M, Simoni P, Montoya A, Maiolini E, Girotti S, Roda A. Development of a chemiluminescence-based quantitative lateral flow immunoassay for on-field detection of 2,4,6-trinitrotoluene. *Anal. Chim. Acta* 2012, 721:167-172.
5. Montagnani M, Tsivian M, Neri F, Zvi IB, Mantovani I, Nanni P, Benevento M, Simoni P, Marangoni A, Pariali M, Fato R, Bergamini C, Leoni S, Azzaroli F, Mazzella G, Nardo B, Roda E, Aldini R. A new model for portal protein profile analysis in course of ileal intraluminal bile acid infusion using an in situ perfused rat intestine. *Med Chem.* 2011 Jul;7(4):257-64.
6. Roda A, Roda B, Cevenini L, Michelini E, Mezzanotte L, Reschiglian P, Hakkila K, Virta M. Analytical strategies for improving the robustness and reproducibility of bioluminescent microbial bioreporters. *Anal Bioanal Chem.* 2011, 401(1):201-11. (Affiliazione INBB)
7. Roda A, Cevenini L, Michelini E, Branchini BR. A portable bioluminescence engineered cell-based biosensor for on-site applications. *Biosens Bioelectron.* 2011, 26(8):3647-53. (Affiliazione INBB)
8. Roda A, Mirasoli M, Dolci LS, Buragina A, Bonvicini F, Simoni P, Guardigli M. Portable device based on chemiluminescence lensless imaging for personalized diagnostics through multiplex bioanalysis. *Anal Chem.* 2011, 83(8):3178-85. (Affiliazione INBB)
9. Roda A, Mezzanotte L, Aldini R, Michelini E, Cevenini L. A new gastric-emptying mouse model based on in vivo non-invasive bioluminescence imaging. *Neurogastroenterol Motil.* 2010, 22(10):1117-e288. (Affiliazione INBB)
10. Michelini E, Cevenini L, Mezzanotte L, Coppa A, Roda A. Cell-based assays: fuelling drug discovery. *Anal Bioanal Chem.* 2010, 398(1):227-38. (Affiliazione INBB)
11. Mezzanotte L, Fazzina R, Michelini E, Tonelli R, Pession A, Branchini B, Roda A. In vivo bioluminescence imaging of murine xenograft cancer models with a red-shifted thermostable luciferase. *Mol Imaging Biol.* 2010, 12(4):406-14. (Affiliazione INBB)
12. Roda A, Mirasoli M, Dolci LS, Buragina A, Bonvicini F, Simoni P, Guardigli M. Portable device based on chemiluminescence lensless imaging for personalized diagnostics through multiplex bioanalysis. *Anal Chem.* 2011 Apr 15;83(8):3178-85.

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Saranno sviluppati sistemi analitici portatili miniaturizzati di tipo Point-of-Care (POC) per analisi in campo diagnostico come sistemi diagnostici nella medicina personalizzata, nella analisi ambientale e alimentare basati su diversi principi di luminescenza e reazioni di riconoscimento biomolecolare. Tali sistemi implementeranno anche dispositivi in grado di effettuare il trattamento pre-analitico del campione basati su tecniche innovative quali il frazionamento in campo flusso (FFF) andando a costituire sistemi tipo lab-on-a-chip. Saranno inoltre ottenuti nuovi geni reporter bioluminescenti con caratteristiche spettrali ottimizzate per applicazioni multianalta e verranno sviluppati nuovi modelli animali bioluminescenti per monitorare simultaneamente più eventi fisio-patologici nello stesso animale.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

- Prof. Bruce Branchini, Department of Chemistry, Connecticut College, New London, CT, USA (Cloning and bioanalytical applications of new luciferases)
- Prof. Sylvia Daunert, Department of Chemistry, University of Kentucky, Lexington, KY, USA (obtainment of aequorin mutants, characterized by improved spectral and emission kinetics characteristics)
- Prof. Anders Rane, Clinical Pharmacology, Karolinska Institutet, 14186 Stockholm, Sweden (applicazione di biosensori cellulari bioluminescenti per anti-doping e diagnostica)

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

- Lettore di micropiastre multimodale (spettrofotometrico, spettrofluorimetrico e bio-chemiluminescente) Thermo Scientific Varioskan Flash
- Luminografo LB 981 EG&G Berthold
- Microscopio ad epifluorescenza collegato a camera CCD ultrasensibile raffreddata con azoto liquido
- Spettrometro di massa triplo quadrupolo equipaggiato con interfaccia elettrospray e APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation)
- Spettrometro di massa ibrido quadrupolo/tempo di volo (Q-TOF) equipaggiato con interfaccia elettrospray e nanospray - MJ Mini Thermal Cyclor

PAROLE CHIAVE

Bio-chemiluminescenza
Imaging bioluminescente in vivo
Metodi immunometrici e genici
Biosensori (cellulari)
Spettrometria di massa

UNITA' DI RICERCA INBB
Messina

RESPONSABILE SCIENTIFICO

SAIJA ANTONELLA

LINEA DI RICERCA

Risposta cellulare a stress tossico da agenti chimici

Agenti naturali bioattivi per la salute dell'uomo

Nutrigenomica

Genetica molecolare umana, malattie genetiche e tossicogenetica

Sicurezza e tossicità di prodotti per la salute, biomateriali, cosmetici e agenti chimici

Biomarkers di effetto in condizioni patologiche e fisiopatologiche

Tossicità da contaminanti/residui alimentari

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Saija Antonella

PO

asaija@unime.it

Cimino Francesco

RU

fcimino@unime.it

Non Aderenti INBB

Trombetta Domenico

RU

dtrombetta@unime.it

Speciale Antonio

A (specializzando)

Specialea@gmail.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Indirizzo Dipartimento di Scienze del farmaco e dei Prodotti della Salute, Univ. Messina

Telefono 0906766480

Fax 0906766474

E-mail asaija@unime.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Catania

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

- In passato il gruppo di ricerca si era interessato dello studio di prodotti vegetali ad attività antiossidante, i quali, assunti attraverso la normale dieta o mediante supplementazione dietetica, siano capaci di prevenire la comparsa di condizioni patologiche collegate allo stress ossidativi. Negli ultimi tre anni il gruppo di ricerca si è interessato delle proprietà ermetiche di questi prodotti, i quali agendo come deboli agenti stressanti posono preparare le cellule a resistere a stress più gravi. In particolare si è investigata la capacità delle antocianine e di estratti arricchiti in antocianine di modulare le vie di segnale cellulari, con particolare riguardo per la via di Nrf2/Keap1 e di NF-κB.

- Da qualche anno si configura l'importanza della "teragnostica", una branca della biomedicina che nasce dalla combinazione di tecnologie che integrano lo sviluppo di terapie e di tool diagnostici basati su biomarker (derivati da geni, proteine e/o metaboliti); grazie a questo approccio innovativo si può ottenere un profilo terapeutico che caratterizza il singolo paziente e la sua risposta alla terapia. Il gruppo di ricerca in questi ultimi anni si è interessato dello studio di nuovi marker circolanti di stress ossidativo (prodotti di ossidazione avanzata delle proteine, prodotti finali di glicazione avanzata, proteine nitrosilate, proteine carbossilate) in particolare in pazienti affetti da patologie emato-oncologiche e su base infiammatoria/immunitaria.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

- Cimino F, Balestra C, Germonpre P, De Bels D, Tillmans F, Saija A, Speciale A, Virgili F. Pulsed high oxygen induces a hypoxic-like response in Human Umbilical Endothelial Cells (HUVECs) and in humans. *J Appl Physiol*. 2012 Oct 4. [Epub ahead of print]

- Iannazzo D, Piperno A, Ferlazzo A, Pistone A, Milone C, Lanza M, Cimino F, Speciale A, Trombetta D, Saija A, Galvagno S. Functionalization of multi-walled carbon nanotubes with coumarin derivatives and their biological evaluation. *Org Biomol Chem*. 2012 Feb 7;10(5):1025-31.

- Musolino C, Allegra A, Saija A, Alonci A, Russo S, Spatari G, Penna G, Gerace D, Cristani M, David A, Saitta S, Gangemi S. Changes in advanced oxidation protein products, advanced glycation end products, and s-nitrosylated proteins, in patients affected by polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Clin Biochem*. 2012 Jul 28. [Epub ahead of print]

- Spatari G, Saitta S, Cimino F, Sapienza D, Quattrocchi P, Carrieri M, Barbaro M, Saija A, Gangemi S. Increased serum levels of advanced oxidation protein products and glycation end products in subjects exposed to low-dose benzene. *Int J Hyg Environ Health*. 2012;215(3):389-92.

- Speciale A, Chirafisi J, Saija A, Cimino F. Nutritional antioxidants and adaptive cell responses: an update. *Curr Mol Med.* 2011;11(9):770-89.
- Speciale A, Anwar S, Ricciardi E, Chirafisi J, Saija A, Cimino F. Cellular adaptive response to glutathione depletion modulates endothelial dysfunction triggered by TNF- α . *Toxicol Lett.* 2011;207(3):291-7.
- Musolino C, Allegra A, Alonci A, Saija A, Russo S, Cannavò A, Cristani M, Centorrino R, Saitta S, Alibrandi A, Gangemi S. Carbonyl group serum levels are associated with CD38 expression in patients with B chronic lymphocytic leukemia. *Clin Biochem.* 2011;44(17-18):1487-90.
- Speciale A, Canali R, Chirafisi J, Saija A, Virgili F, Cimino F. Cyanidin-3-O-glucoside protection against TNF- α -induced endothelial dysfunction: involvement of nuclear factor- κ B signaling. *J Agric Food Chem.* 2010 24;58(22):12048-54.
- Trombetta D, Cimino F, Cristani M, Mandalari G, Saija A, Ginestra G, Speciale A, Chirafisi J, Bisignano G, Waldron K, Narbad A, Faulds CB. In vitro protective effects of two extracts from bergamot peels on human endothelial cells exposed to tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha). *J Agric Food Chem.* 2010 28;58(14):8430-6.
- Morabito G, Trombetta D, Singh Brajendra K, Prasad Ashok K, Parmar Virinder S, Naccari C, Mancari F, Saija A, Cristani M, Firuzi O, Saso L. Antioxidant properties of 4-methylcoumarins in in vitro cell-free systems. *Biochimie.* 2010;92(9):1101-7.
- Musolino C, Alonci A, Allegra A, Saija A, Penna G, Cannavò A, Cristani M, Saitta S, Gangemi S. Increase in serum protein carbonyl groups is associated with more advanced stage of disease in multiple myeloma patients. *Biomarkers.* 2011;16(8):718-9.

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Obiettivo del gruppo di ricerca è quello di contribuire a spiegare se le proprietà ormetiche di prodotti bioattivi di origine vegetale possono essere utilizzate con successo per realizzare interventi finalizzati alla protezione della salute e del benessere dell'uomo, anche in patologia a notevole impatto, tra cui l'aterosclerosi.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

Institute of Food Research, Norwich, UK

Department de Bioquímica, Universitat de Barcelona, Spain

School of Pharmacy, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA, USA

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

- sistemi elettroforetici verticali di diverse dimensioni per la separazione delle proteine e sistemi di elettroforesi orizzontale per sviluppo di campioni di DNA;
- sistema per blotting semi-dry
- RealTime-PCR (7300 Applied Biosystem)
- facility per manipolazione di colture cellulari sia primarie che continue
- sistemi HPLC equipaggiati con diversi detector (DAD, UV/Vis, fluorimetrico, elettrochimico)
- laboratorio per spettrofotometria Uv/Vis e spettrofluorimetria

PAROLE CHIAVE

Fitocomposti antiossidanti - Risposte adattative – Biomarkers – Infiammazione - Aterosclerosi

UNITA' DI RICERCA INBB
Parma

RESPONSABILE SCIENTIFICO

SPISNI ALBERTO

LINEA DI RICERCA

Uso integrato della spettrometria NMR multidimensionale e multinucleare, della spettroscopia di dicroismo circolare (CD) e di fluorescenza, con calcoli di modellismo molecolare per lo studio della struttura e dinamica in soluzione di peptidi biologicamente attivi e di proteine.

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Franzoni Lorella	PA	lfranz@unipr.it
------------------	----	-----------------

Non Aderenti INBB

Casali Emanuela	RU	emanuela.casali@unipr.it
Ferrari Elena	RU	elena.ferrari@unipr.it
Pertinhez Thelma	BC	thelma@unipr.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Trasnali, Università di Parma.

Indirizzo: Via Volturmo, 39

Telefono: 0521 033801/7

Fax: 0521 0033802

E-mail: alberto.spisni@unipr.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Milano

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

Determinare la struttura tridimensionale in soluzione di peptidi e proteine e correlazione alla loro funzione. I sistemi attualmente allo studio sono peptidi caratterizzati di attività antimicrobica, proteine appartenenti alla super-famiglia delle lipocaline quali una proteina appartenente alla famiglia delle Major Urinary Proteins (MUP) e la cellular Retinol Binding Protein (cRBP) entrambe appartenenti alla famiglia delle FABP. Sono oggetto di studio tossine come la crotamina, presente nel veleno di serpente (crotalo) ed altre tossine attive sui canali del K e presenti nel veleno di scorpione. Infine si studiano le strutture di proteine di funzione ancora sconosciuta derivate dal genoma di parassiti delle arance e di alberi quali i platani e gli olmi. Le tecniche utilizzate sono la spettrometria NMR multinucleare e multidimensionale, il CD e la fluorescenza. I peptidi sono sintetici, le proteine di MW superiore ai 5Kd sono ricombinanti e sono clonate ed espresse nel nostro laboratorio in forma nativa e modificate sito-specificamente. Per proteine di MW inferiore ai 5Kd si usano proteine native. Sia l'estrazione che la purificazione sono condotte in laboratorio. Infine si usano metodiche di calcolo di simulazione di dinamica molecolare per rappresentare la struttura 3D di questi polipeptidi e per descriverne le caratteristiche di flessibilità molecolare.

Risultati ottenuti

Sono state risolte le strutture di peptidi ad attività antimicrobica. Sono state risolte le strutture di due proteine derivate dal genoma di parassiti delle arance. Inoltre stata risolta la struttura di una tossina prodotta da un fungo che risulta tossico per i platani. Tutto ciò è stato realizzato combinando la biologia molecolare per produrre le proteine con la spettrometria NMR multinucleare e multidimensionale e la spettroscopia CD.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010--2012

- 1) Gallo M, Ferrari E, Eliseo T, Amata I, Pertinhez TA, Katsuyama AM, Paci M, Farah CS, Spisni A and Cicero DO
"A new member of the ribbon-helix-helix transcription factor superfamily from the plant pathogen Xanthomonas axonopodis pv. citri"
J Struct Biol. (2010) **17**, 21-31 (IF: 4.059)
- 2) T.A. Pertinhez, A. Spisni
"Ligands turning around in the midst of protein conformers: the origin of ligand-protein mating. A NMR view"
Curr. Top. Med. Chem. (2011) **11**, 158-170. (ISSN 1568-0266), (IF 2009 = 4.473)

- 3) A.L. Oliveira, M. Gallo, L. Pazzagli, C.E. Benedetti, G. Cappugi, A. Scala, B. Pantera, A. Spisni, T.A. Pertinhez, D.O. Cicero
"The structure of the elicitor Cerato-platanin, founder of the CP fungal protein family, reveals a double $\Psi\beta$ -barrel fold and carbohydrate binding"
 J. Biol. Chem. (2011) **286**, 17560-8 (ISSN 0021-9258). (IF 2009 = 5.328)
- 4) Walter Magliani, Stefania Conti, Tecla Ciociola, Laura Giovati, Pier Paolo Zanello, Thelma Pertinhez, Alberto Spisni, Luciano Polonelli
"Killer peptide: a novel paradigm of antimicrobial, antiviral and immunomodulatory auto-delivering drugs"
 Future Medicinal Chemistry (2011) **3**, 1209-1231 (ISSN 1756-8919) (IF 2011 = 2,522)
- 5) Ferrari E., Yacoub M.-R., Breda D., Longhi R., Vangelista L., Nakaie C.R., Elviri L., Casali E., Pertinhez T.A., Spisni A., Burastero S.E.
"Strong Reduction of a Major Urinary Protein Allergenicity by a Structurally Guided Single Point Mutation"
 Int. Arch. Allergy Immunol. (2012) **157**, 226-237 (ISSN 1018-2438), (IF 2009: 2.542)
- 6) Polonelli L., Ciociola T., Magliani W., Zanello P.P., D'Adda T., Galati S., De Bernardis F., Arancia S., Gabrielli E., Pericolini E., Vecchiarelli A., Arruda D.C., Pinto M.R., Travassos L.R., Pertinhez T.A., Spisni A., Conti S.
"Peptides of the Constant Region of Antibodies Display Fungicidal Activity"
 PLoSOne (2012) **7**, e34105 (I.F. 2010 4,411)
- 7) Stehling E.G., Sforça M.L., Zanchin N.I.T., Oyama S. Jr., Pignatelli P., Belluzzi O., Polverini E., Corsini R., Alberto Spisni and Thelma A. Pertinhez,
"Looking over toxins - K^+ channel interaction. Clues from the structural and functional characterization of the α -KTx toxin Tc32: a Kv1.3 channel blocker"
 Biochemistry (2012) **51**, 1885-94 (I.F. 2010 3,226)

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Studiare alcuni aspetti del processo di unfolding e refolding della rMUP, proseguire lo studio delle tossine di veleno di scorpione attive sui canali del K e di tossine presenti in funghi filamentosi. Proseguire lo studio sul rapporto struttura funzione di peptidi ad attività antibatterica. Clonare ed esprimere mutanti sito specifici della MUP e di tossine attive sui canali del potassio per modularne la funzione biologica, in particolare l'azione allergenica.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

- Prof. Gianni Cappugi, Dipartimento di Scienze biologiche, Università di Firenze
- Prof. Eliane Candiani Arantes Braga, Facoltà di Farmacia, Universidade de São Paulo a Ribeirão Preto

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

- Spettrofotometro per dicroismo circolare Jasco J715
- NMR Varian Inova 600
- Sistema per purificazione di proteine Akta Purifier
- Spettrometri di Massa 1) MALDI-TOF Micromas e 2) Orbitrap
- Microcalorimetro per misure ICT
- DLS Malvern z-sizer

PAROLE CHIAVE

NMR, CD, proteine, struttura, dinamica molecolare.

UNITA' DI RICERCA INBB
Firenze

RESPONSABILE SCIENTIFICO

STEFANI MASSIMO

LINEA DI RICERCA

Unita funzionali biologiche sopramolecolari

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Stefani Massimo PO stefani@scibio.unifi.it

Non Aderenti INBB

Bucciantini Monica RU monica.bucciantini@unifi.it

Cecchi Cristina RU cristina.cecchi@unifi.it

Rigacci Stefania BC stefania.rigacci@unifi.it

Evangelisti Elisa BC elisa.evangelisti@unifi.it

Leri Manuela DR

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Indirizzo Dip. Scienze Biochimiche Viale Morgagni 50, 50134 Firenze

Telefono 055.4598307

Fax 055.4598905

E-mail stefani@scibio.unifi.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Bologna

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

- 1) Studiare le proprietà biofisiche e conformazionali di oligomeri e altri aggregati amiloidi e la relazione tra queste e la citotossicità
- 2) Studiare l'effetto delle proprietà biofisiche di doppi stati lipidici sintetici e membrane cellulari sul potenziale citotossico di aggregati amiloidi.
- 3) Cercare e caratterizzare molecole capaci di interferire col processo di aggregazione e la tossicità degli aggregati investigando i meccanismi ed i citoprotezioni da parte delle stesse

Risultati ottenuti

- 1) Sono stati studiate e definite le caratteristiche biofisiche e conformazionali di due tipi di oligomeri amiloidi della stessa proteina formati in condizioni diverse e la loro relazione con la differente tossicità degli stessi. E' stato descritto il contributo alla tossicità delle caratteristiche biofisiche della membrana delle cellule esposte modulandone il contenuto lipidico. E' stato introdotto il principio secondo cui la tossicità degli oligomeri non è una proprietà intrinseca ma il risultato complessivo del contributo fornito dalle caratteristiche degli stessi e di quelle della membrana cellulare.
- 2) Sono state studiate le caratteristiche biofisiche di doppi stati lipidici a diverso contenuto lipidico e il loro effetto sulla formazione di oligomeri di lisozima e sull'interazione di questi con i doppi stati stessi.
- 3) *E' stato studiato il meccanismo con cui fibrille amiloidi mature della proteina prionica Sup35 interagiscono con la membrana di cellule esposte e causano alle stesse effetti tossici.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

1. Oleuropein aglycon prevents cytotoxic amyloid aggregation of human amylin (S. Rigacci, V. Guidotti, M. Bucciantini, M. Parri, C. Nediani, E. Cerbai, M. Stefani & A. Berti) *J. Nutr. Biochem.* (2010).21: 726-35. IF 4.288
2. Aberrant protein oligomer structures are causatively linked to cellular dysfunction (S. Campioni, B. Mannini, A. Pensalfini, M. Zampagni, C. Parrini, E. Evangelisti, A. Relini, M. Stefani, C.M. Dobson, C. Cecchi & F. Chiti) *Nat. Chem. Biol.* (2010) 6:140-147. IF 16.058
3. Biochemical and biophysical features of both oligomer/fibril and cell membrane in amyloid cytotoxicity (M. Stefani) *FEBS J.* (2010) 277:4602-13. IF 3.042
4. Effect of tetracyclines on the dynamics of formation and decomposition of β 2-m amyloid fibrils (S. Giorgetti, S. Raimondi, A. Relini, M. Bucciantini, K. Pagano, A. Corazza, M.C. Mimmi, M. Salmona, P. Mangione, F. Fogolari, L. Colombo, L. Marchese, A. Gliozzi, M. Stefani, G. Esposito, M. Stoppini & V. Bellotti) *J. Biol. Chem.* (2011) 286:2121-31. IF 5.328

5. A β (1-42) aggregates into non-toxic amyloid assemblies in the presence of the natural polyphenol oleuropein aglycon (S. Rigacci, V. Guidotti, M. Bucciantini, D. Nichino, A. Relini, A. Berti & M. Stefani) *Curr. Alz. Res.* (2011) 8:841-52. I.F. 4.953
6. Amyloid polymorphisms: structural basis and significance in biology and molecular medicine (M. Stefani) in "Lipids and Membranes in Amyloid Diseases" (R. Jelinek Ed.) Wiley-VCH Verlag (2011) pp. 131-142.
7. Neuronal differentiation of human mesenchymal stromal cells increases the resistance to A β 2 aggregate toxicity (C. Cecchi, E. Evangelisti, R. Cascella, M. Zampagni, S. Benvenuti, P. Luciani, C. Deledda, I. Cellai, R. Saccardi, A. Peri & M. Stefani) *J. Alz. Dis.* (2011) 27:651-64. I.F. 3.832.
8. Toxic effects of amyloid fibrils on cell membranes: the importance of ganglioside GM1 (M. Bucciantini, D. Nosi, M. Forzan, E. Russo, M. Calamai, L. Pieri, L. Formigli, F. Quercioli, S. Soria, F. Pavone, J. Savistchenko, R. Melki & M. Stefani) *FASEB J.* (2012) 26:818-31. I.F. 6.515.
9. Membrane lipid composition and its physicochemical properties define cell vulnerability to aberrant protein oligomers (E. Evangelisti, C. Cecchi, R. Cascella, C. Sgromo, G. Liguri, C.M. Dobson, F. Chiti & M. Stefani) *J. Cell Sci.* (2012) 125:2416-27. I.F. 6.29
10. Interaction of lysozyme with negatively charged lipid bilayers results in protein aggregation with membrane fusion (T. Al Kayal, S. Nappini, E. Russo, G. Caminati, D. Berti, M. Bucciantini, M. Stefani & P. Baglioni) *Soft matter* (2012) 8:4524-4534. I.F. 4.46
11. Growth, Structural features and cytotoxicity of amyloid oligomers: implications in alzheimer's disease and other diseases with amyloid deposits (M. Stefani) (2012) *Progr. Neurobiol.* Epub Mar 23. I.F. 9.966
12. Interactions of lysozyme with phospholipid vesicles: effects of vesicle biophysical features on protein misfolding and aggregation (T. Al Kayal, E. Russo, L. Pieri, G. Caminati, D. Berti, M. Bucciantini, M. Stefani & P. Baglioni) *Soft matter* (2012) doi 10.1039/c2sm25992c. I.F. 4.46

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

- 1) Sviluppare le conoscenze anche a livello clinico attraverso un trial clinico mirato di una molecola con promettenti effetti anti-Alzheimer e anti-diabete
- 2) Estendere a oligomeri di altri peptidi/proteine i dati ottenuti su HypF-N per generalizzare l'idea che la citotossicità degli oligomeri amiloidi dipende da una complessa interrelazione tra proprietà biofisiche degli oligomeri e delle membrane cellulari con cui interagiscono.
- 3) Definire il destino di oligomeri una volta penetrati nella cellula dall'esterno.
- 4) Studiare gli effetti a livello funzionale (elettrofisiologico) di oligomeri tossici di TTR su cardiomiociti in coltura

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

- 1) C.M. Dobson, Cambridge U.K.
- 2) Ronald melki, CNRS Gif-Sur-Yvette, Paris
- 3) Susan Lindquist Cambridge, MA

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

Attrezzatura per indagini spettroscopiche di proteine (FT-IR, DLS, CD, Spettrofluorimetri e spettrofotometri, Stopped-flow apparatus)

Microscopio confocale

Fluorimetri a flusso con cell sorter

Attrezzatura per colture cellulari

PAROLE CHIAVE

Aggregazione di proteine; Amiloide; amiloide, citotossicità; oligomeri amiloidi

UNITA' DI RICERCA INBB
Campobasso

RESPONSABILE SCIENTIFICO:

TAGLIALATELA MAURIZIO

LINEA DI RICERCA

Ruolo fisiopatologico e farmacologico dei canali ionici

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Maurizio Tagliatela	PO	m.tagliatela@unimol.it; mtagial@unina.it
---------------------	----	---

Non Aderenti INBB

MariaVirginia Soldovieri	RU	mariavirginia.solodovieri@unimol.it
Francesco Miceli	BC	frmiceli@unina.it
Vincenzo Barrese	DR	vbarrese@alice.it
Paolo Ambrosino	BC	paolo.ambrosino@unimol.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Indirizzo Dipartimento di Medicina e Scienze della Salute, Università del Molise
Via de Sanctis, 86100 Campobasso

Telefono 0874-404894

Fax 0874-404763

E-mail m.tagliatela@unimol.it; mtagial@unina.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Bari-Napoli

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Obiettivi

Identificazione del ruolo funzionale, fisiopatologico e farmacologico dei canali del potassio voltaggio-dipendenti Kv7 a livello di diversi distretti (SNC, apparato gastroenterico, muscolatura liscia vascolare, muscolatura striata)

Risultati ottenuti

Il nostro gruppo di ricerca ha descritto numerose mutazioni a carico dei canali Kv7.2 e Kv7.3 in famiglie affette da malattie neurologiche rare, studiandone al contempo il meccanismo molecolare di danno attraverso studi elettrofisiologici, biochimici, e molecolari. È stato inoltre individuato il ruolo di tali canali nella muscolatura liscia dello stomaco, nel muscolo liscio vascolare, e nella muscolatura striata scheletrica.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

1. Miceli F, Vargas E, Bezanilla F, Tagliatela M. Gating currents from Kv7 channels carrying neuronal hyperexcitability mutations in the voltage-sensing domain. *Biophys J*. 2012 Mar 21;102(6):1372-82.
2. Samengo I, Currò D, Navarra P, Barrese V, Tagliatela M, Martire M. Molecular and pharmacological evidence for a facilitatory functional role of pre-synaptic GLUK2/3 kainate receptors on GABA release in rat trigeminal caudal nucleus. *Eur J Pain*. 2012 Sep;16(8):1148-57.
3. Di Capua R, Barra M, Santoro F, Viggiano D, Ambrosino P, Soldovieri MV, Tagliatela M, Cassinese A. Towards the realization of label-free biosensors through impedance spectroscopy integrated with IDES technology. *Eur Biophys J*. 2012 Feb;41(2):249-56.
4. Nizzari M, Barbieri F, Gentile MT, Passarella D, Caorsi C, Diaspro A, Tagliatela M, Pagano A, Colucci-D'Amato L, Florio T, Russo C. Amyloid- β protein precursor regulates phosphorylation and cellular compartmentalization of microtubule associated protein tau. *J Alzheimers Dis*. 2012 Jan 1;29(1):211-27.
5. Soldovieri MV, Miceli F, Tagliatela M. Driving with no brakes: molecular pathophysiology of Kv7 potassium channels. *Physiology (Bethesda)*. 2011 Oct;26(5):365-76.
6. Ipavec V, Martire M, Barrese V, Tagliatela M, Currò D. KV7 channels regulate muscle tone and nonadrenergic noncholinergic relaxation of the rat gastric fundus. *Pharmacol Res*. 2011 Oct;64(4):397-409.
7. Miceli F, Soldovieri MV, Iannotti FA, Barrese V, Ambrosino P, Martire M, Cilio MR, Tagliatela M. The Voltage-Sensing Domain of K(v)7.2 Channels as a Molecular Target for Epilepsy-Causing Mutations and Anticonvulsants. *Front Pharmacol*. 2011;2:2.
8. Santoro L, Manganelli F, Fortunato MR, Soldovieri MV, Ambrosino P, Iodice R, Pisciotto C, Tessa A, Santorelli F, Tagliatela M. A new Italian FHM2 family: clinical aspects and functional analysis of the disease-associated mutation. *Cephalalgia*. 2011 May;31(7):808-19.

9. Cataldi M, Panuccio G, Cavaccini A, D'Antuono M, Tagliatela M, Avoli M. Involvement of inward rectifier and M-type currents in carbachol-induced epileptiform synchronization. *Neuropharmacology*. 2011 Mar;60(4):653-61.
10. Martire M, Barrese V, D'Amico M, Iannotti FA, Pizzarelli R, Samengo I, Viggiano D, Ruth P, Cherubini E, Tagliatela M. Pre-synaptic BK channels selectively control glutamate versus GABA release from cortical and hippocampal nerve terminals. *J Neurochem*. 2010 Oct;115(2):411-22.
11. D'Amico M, Samengo I, Navarra P, Tagliatela M, Martire M. AMPA- and P2X7-receptor-mediated facilitation of [3H]D-aspartate release from nerve terminals isolated from the rat caudal brainstem. *Neurochem Int*. 2010 Nov;57(6):623-8.
12. Iannotti FA, Panza E, Barrese V, Viggiano D, Soldovieri MV, Tagliatela M. Expression, localization, and pharmacological role of Kv7 potassium channels in skeletal muscle proliferation, differentiation, and survival after myotoxic insults. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010 Mar;332(3):811-20.

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Intendiamo definire le correlazioni geneotipo-fenotipo per patologie convulsive associate a mutazioni dei canali Kv7 e sostanziare ulteriormente come tali proteine di membrana possano fungere da targets molecolari per farmaci ad attività anticonvulsivante ed antinocicettiva.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

Prof. Francisco Bezanilla, University of Chicago (USA)

Prof. Rym Benkhalifa, Pasteur Institute, Tunis (TN)

Prof. Alvaro Villarroel, Unidad de Biofísica CSIC-UPV/EHU, Bilbao (ES)

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

3 Set-ups per registrazioni elettrofisiologiche su singola cellula (patch-clamp)

1 FACS-Scanner

1 Biacore per Surface-plasmon resonance

1 sequenziatore DNA ABI-Prism

1 Microscopio con testata confocale

Diversi termociclatori per PCR

PAROLE CHIAVE

LS5 Neurosciences and neural disorders: neurobiology, neuroanatomy, neurophysiology, neurochemistry, neuropharmacology, neuroimaging, systems neuroscience, neurological disorders, psychiatry

LS5_2 Molecular and cellular neuroscience

LS5_5 Mechanisms of pain

UNITA' DI RICERCA INBB
Genova

RESPONSABILE SCIENTIFICO:

VERGANI LAURA

LINEA DI RICERCA

Meccanismi molecolari coinvolti nella regolazione dell'omeostasi lipidica e nel bilancio ossidativo degli organismi e negli aspetti fisiopatologici ad essi correlati.

COMPOSIZIONE DEL GRUPPO

Aderenti INBB

Grasselli Elena RU elena.grasselli@unige.it

Non Aderenti INBB

Voci Adriana PA vocia@unige.it

Demori Ilaria RU Ilaria.Demori@unige.it

Compalati Andrea BC scompala@virgilio.it

Valter Capicchioni PT valter.capicchioni@unige.it

SEDE UNITÀ DI RICERCA

Indirizzo Corso Europa 26

Telefono 010-353-8403

Fax 010-3538267

E-mail Laura.Vergani@unige.it

SEZIONE INBB DI APPARTENENZA

Genova

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Nel corso degli ultimi 3 anni l'attività di ricerca è stata focalizzata in particolare sui seguenti argomenti:

Obiettivi

1. Studio dei meccanismi molecolari coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi lipidica nei mammiferi, con particolare attenzione agli effetti degli ormoni tiroidei nella regolazione dell'espressione di geni del metabolismo lipidico nel fegato di ratto.
2. Studio del ruolo delle metallotioneine nei meccanismi di difesa dallo stress ossidativo ipotizzando un loro coinvolgimento in diverse condizioni fisio-patologiche quali la steatosi epatica, malattie neurodegenerative (Sclerosi Laterale Amiotrofica-SLA, Sclerosi Multipla-SM), disturbi comportamentali (Autismo e sindrome di Rett).

Risultati ottenuti

1. Tra i risultati più importanti in tale campo si è dimostrato come gli effetti antisteatosici degli ormoni tiroidei e della diiodotironina T₂ sul fegato di ratto dipendano principalmente da una loro azione diretta sulla cellula epatica ed i meccanismi siano essenzialmente indipendenti dai recettori per gli ormoni tiroidei e coinvolgano le proteine PAT associate alle vescicole lipidiche.
2. I risultati hanno confermato la presenza di una condizione di sbilanciamento ossidativo nelle condizioni fisio-patologiche analizzate. Di particolare interesse i risultati che hanno dimostrato come l'efficacia terapeutica delle cellule staminali mesenchimali sul rallentamento della progressione di malattie neurodegenerative (utilizzando modelli animali di SM e SLA) sia sostenuta da una parallela riduzione dello stress ossidativo nei tessuti nervosi.

PUBBLICAZIONI PIÙ SIGNIFICATIVE NEL PERIODO 2010-2012

E. Grasselli, A. Voci, C. Pesce, L. Canesi, E. Fugassa, G. Gallo. and L. Vergani "PAT protein mRNA expression in primary rat hepatocytes: effects of exposure to fatty acids" International Journal of Molecular Medicine Apr;25(4):505-12, 2010 * **Affiliazione INBB**

L. Canesi, C. Barmo, R. Fabbri, C. Ciacci, L. Vergani, P. Roch, G. Gallo "Effects of vibrio challenge on digestive gland biomarkers and antioxidant gene expression in *Mytilus galloprovincialis*" Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. Sep;152(3):399-406, 2010

E. Grasselli, A. Voci, L. Canesi, F. Goglia, S. Ravera, I. Panfoli, G. Gallo and L. Vergani "Non-receptor mediated actions are responsible for the lipid-lowering effects of iodothyronines in FaO rat hepatoma cells" Journal of Endocrinology Jul;210(1):59-69, 2011 (DOI: 10.1530/JOE-11-0074) * **Affiliazione INBB**

L. Vergani, C. Lanza, P. Rivaro, M. Abelmoschi, S. Genti, E. Veneselli, G. Minniti, E. Grasselli, L. Canesi, A. Voci "Metals, metallothioneins and oxidative stress in blood of autistic children" Research in Autism Spectrum Disorders 5 (1), 286-293, 2011 (DOI 10.1016/j.rasd.2010.04.010) * **Affiliazione INBB**

E. Grasselli, A. Voci, L. Canesi, E. Fugassa, R. De Matteis, G. Gallo and L. Vergani "Direct effects of 3,5-diiodo-L-thyronine (T2) on fat accumulation in primary cultures of rat hepatocytes" Journal of Hepatology Jun;54(6):1230-6, 2011 (DOI: 10.1016/j.jhep.2010.09.027)

E. Grasselli, A. Voci, I. Demori, L. Canesi, R. De Matteis, F. Goglia, A. Lanni, G. Gallo and L. Vergani "3,5-diiodo-L-thyronine (T2) modulates the expression of genes of lipid metabolism in a rat model of fatty liver" Journal of Endocrinology Feb;212(2):149-58 2012 * **Affiliazione INBB**

C. Lanza, S. Raimondo, L. Vergani, N. Catena, F. Sénès, P. Tos, S. Geuna "Expression of antioxidant molecules after peripheral nerve injury and regeneration." Journal of Neuroscience Research Apr;90(4):842-8. 2012 (doi: 10.1002/jnr.22778. Epub 2012 Jan 18)

A. Uccelli, M. Milanese, MC. Principato, S. Morando, Bonifacino T., L. Vergani, D. Giunti, A. Voci, E. Carminati, F. Giribaldi, C. Caponnetto and GB Bonanno "Intravenous Mesenchymal Stem Cells Improve Survival and Motor Function in Experimental Amyotrophic Lateral Sclerosis" Molecular Medicine Apr 2, 2012 (doi: 10.2119/molmed.2011.00498)

D. Giunti, B. Parodi, C. Usai, L. Vergani, S. Casazza, S. Bruzzone, G. Mancardi, A. Uccelli "Mesenchymal Stem Cells Shape Microglia Effector Functions Through the Release of CX3CL1" Stem Cells Sep;30(9):2044-53. 2012 (doi: 10.1002/stem.1174)

PROSPETTIVE ED OBIETTIVI PER I PROSSIMI TRE ANNI

Si intende proseguire le linee di ricerca sopra descritte al fine (i) di approfondire i meccanismi coinvolti nella regolazione dell'omeostasi lipidica nel fegato di mammiferi ed individuare possibili molecole con attività anti-steatosica; (ii) di identificare le alterazioni ossidative associate allo sviluppo e progressione di malattie neurodegenerative (sclerosi multipla, sclerosi laterale amiotrofica) e malattie nervose dello sviluppo (autismo, sindrome di Rett), con particolare attenzione ai meccanismi d'azione di nuovi agenti terapeutici.

COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI IN ATTO

- Prof. Milan Vasak, (University of Zürich, Zürich – Switzerland)

- Dr. Arnalud Tanguy (CNRS, UMR 7144, Station Biologique de Roscoff, Roscoff, France)

PRINCIPALI ATTREZZATURE DI CUI DISPONE L'UNITÀ DI RICERCA

- Equipaggiamento completo per colture cellulari (2 cappe a flusso laminare, 3 incubatori, 2 microscopi invertiti) Attrezzatura per biologia molecolare comprendente apparecchi per elettroforesi orizzontale e verticale, 1 termociclatore per PCR convenzionale
- Stazione per analisi di immagini (microscopio Leitz, CCD camera e analizzatore di immagini)
- Spettrofotometro termostato UV-Vis Varian Cary 50E, con accessori
- Termociclatore Biorad 'Chromo 4' four-colours Real-Time System
- Fluorimetro Perkin Elmer
- Apparato per purificazione di proteine in LPLC

PAROLE CHIAVE

LS3_5 - Cell differentiation, physiology and dynamics

LS4_3 – Endocrinology

LS4_5 - Metabolism, biological basis of metabolism related disorders

LS9_1 Genetic engineering, transgenic organisms, recombinant proteins, biosensors

LS5_11 Neurological disorders (e.g. Alzheimer's disease, Huntington's disease, Parkinson's disease)